

文章编号 : 1005- 8982(2009) 11- 1739- 03

肺移植后早期肺泡上皮凋亡及其临床意义

杨国仪¹ 夏钰弘¹ 虞敏红¹ 洪建刚¹ 吴 波² 姜少军² 周晓军²

(1. 南京医科大学附属无锡市人民医院肺移植中心 病理科 江苏 无锡 214023 ;

2. 南京军区南京总医院 病理科 江苏 南京 210002)

摘要 : 目的 探讨肺移植再灌注后肺泡上皮凋亡发生的数量与再灌注损伤关系及与凋亡相关基因 Fas 抗原和 Bcl- 2 的表达情况。方法 应用免疫组化、TUNEL 染色及电镜 ,对 18 例肺移植供肺标本冷缺血保存后 3 和 6 h 以及再灌注后 0.5 和 1.5 h 进行连续观察。结果 再灌注后 0.5 和 1.5 h ,供肺肺泡上皮的凋亡指数明显增加 ($P < 0.01$) ,并与再灌注时间呈正相关 ,Fas 抗原表达明显增强 ,Bcl- 2 表达明显减弱。结论 肺移植后早期就可观察到肺泡上皮凋亡数量增加 ,可能与缺血 / 再灌注损伤有关 ,细胞凋亡的检测对于防治移植肺缺血 / 再灌注损伤中的抗凋亡治疗可能具有意义。

关键词 : 肺移植 缺血再灌注损伤 凋亡 病理学 免疫组织化学

中图分类号 : R 655.3

文献标识码 : B

Occurrence and significance of apoptosis of pneumocytes during ischemia /reperfusion injury of lung transplantation

YANG Guoyi¹, XIA Yuhong¹, YU Minhong¹, HONG Jiangang¹,

WU Bo², JIANG Shaojun², ZHOU Xiaojun²

(1. Department of Pathology, Lung Transplantation Group, Wuxi People's Hospital, Wuxi, Jiangsu 214023, P.R.China; 2. Department of Pathology, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Nanjing, Jiangsu 210002, P.R.China)

Abstract: **[Objectives]** To investigate relationship between the number of the occurrence of apoptosis of pneumocytes and ischemia / reperfusion injurance after transplant reperfusion. And to observe the expression of Fas and Bcl-2 which related to apoptosis. **[Methods]** The lung of 18 cases in human perfused with Raffinose- low- potassium dextran solution (R-LPD'S) was observed by light microscope, electrical microscope. Apoptosis of pneumocytes were stained by the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) technique. And immunohistochemistry for Fas and Bcl-2. **[Results]** Comparing with those taken 3 hours after cold ischemia, the lung tissue taken 0.5 hour and 1.5 hour after reperfusion showed strikingly increasing numbers of apoptotic cells quantified by apoptotic index (AI) ($P < 0.01$). Significantly increasing expression of Fas and decreasing of Bcl-2. **[Conclusion]** Apoptosis of pneumocytes happened during the process of lung transplntation may be one of the features of early ischemia /reperfusion injury .The detection of apoptosis is important for the antiapoptosis treatment of preventing ischemia /reperfusion injury in lung transplantation.

Key words: lung transplantation; ischemia /reperfusion injury; apoptosis pathology; immunohistochemistry

肺移植术后不可避免会发生缺血再灌注 (ischemia reperfusion ,IR) 损伤 ,其发生机制尚未彻底阐明。近年来研究发现 ,细胞凋亡可能在缺血再灌注损伤的病理过程中起着重要的作用。本研究采用

临床肺移植供肺标本 ,观察缺血再灌注损伤及肺泡上皮凋亡与 Fas 抗原、Bcl- 2 的变化 ,探讨其在肺缺血再灌注损伤中的意义。

1 材料与方法

1.1 临床资料

无锡市人民医院肺移植中心中桥分部 2002 年 9 月~2005 年 8 月完成临床肺移植 24 例,收集完整病理资料的肺移植病例 18 例,受体年龄 36~68 岁,平均 47.5 岁,男 15 例,女 3 例,其中单肺 15 例(左肺 9 例,右肺 6 例),非体外循环下序贯式双肺移植 3 例。供体肺灌注液均为棉子糖低钾右旋糖酐液(raffinose- low- potassium dextran solution R-LPD 液)灌注,冷缺血时间 180~465 min,平均 250 min。单肺移植时,对侧供肺灌注后 4℃保存。分别在灌注后 3 h(A 组)、6 h(B 组)取材,肺移植恢复血液供应(再灌注)0.5 h(C 组)、1.5 h(D 组)的肺组织则在移植术中由外科医师分别取材。

1.2 病理材料

各组标本经 10%中性福尔马林液固定,常规脱水,石蜡包埋,每个组织块 4μ m 连续切片,分别进行 HE 染色、免疫组化标记及 TUNEL 标记,光镜观察。

1.2.1 TUNEL 标记 肺泡上皮凋亡原位检测采用 DNA 原位缺口末端标记法(TdT mediated dUTP nick -end labeling,TUNEL),按试剂盒(美国 Roche 公司 In Situ Cell Death Detection Kit,POD)提供方法操作。凋亡的细胞核呈棕黄色,根据细胞凋亡时 DNA 链断裂的程度不同,阳性着色深浅也不同,早期凋亡为浅黄色,晚期凋亡为深棕色,形成凋亡小体时为棕色细颗粒。每张切片随机选择 5 个高倍视野,计数 1 000 个肺泡上皮中的凋亡细胞个数,作为凋亡指数(apoptosis index, AI)。

1.2.2 免疫组化检测 免疫组化染色采用 S-P 法,一抗分别为 Fas 抗原(克隆号 DX2)、Bcl- 2(克隆号 100/D5),免疫组化试剂购自福州迈新生物技术开发有限公司和 DAKO 公司。染色结果根据参考文献以胞膜或胞浆中出现棕黄色颗粒为阳性细胞,阳性细胞数 <10%为(-),阳性细胞数占 10~50%为(+),阳性细胞数 >50%为(++)^[1]。

1.2.3 电镜检查 在各时间段取新鲜肺标本放入 2.5%戊二醛固定(4℃)2 h,1%锇酸后固定 1 h,梯度丙酮脱水,Epon812 环氧树脂包埋,半薄切片定位,70 nm 超薄切片,醋酸铀-柠檬酸铅双重电子染色,日本电子 JEM- 1200 型透射电镜观察。

1.3 统计学分析

实验数据均以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用方差分析,应用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 光镜观察

肺组织灌注保存液后 3 h 时肺组织结构完整,肺泡充气完好,脉管周围组织无明显水肿,6 h 时脉管周围组织可出现轻度的水肿。恢复血液灌注后 1.5 h,血管内见红细胞充盈,脉管周围轻度水肿,可见少量淋巴细胞,未见明显坏死及中性粒细胞浸润。

2.2 凋亡指数及免疫组化结果

2.2.1 肺泡上皮 AI A 组和 B 组中肺泡上皮少量凋亡,C、D 两组 AI 明显高于 A、B 组($P < 0.01$),并且随时间延长有增加趋势,见图 1、2 及表 1。

2.2.2 免疫表型 A 和 B 组中均未见明显 Fas 抗原表达,但见 Bcl- 2 表达,再灌注的 C 组和 D 组中 Fas 抗原表达逐渐增强,Bcl- 2 表达逐渐降低,见表 2。

表 1 不同时间移植肺组织凋亡指数 ($\bar{x} \pm s$)

分组	例数	AI(%)
冷缺血 3 h(A 组)	15	1.61± 1.23
冷缺血 6 h(B 组)	15	1.82± 1.19
再灌注 0.5 h(C 组)	18	5.78± 1.83
再灌注 1.5 h(D 组)	18	11.32± 3.87 [†]

注:†A 和 B 比较 $P > 0.05$,C 和 A 比较 $P < 0.01$,D 和 A 比较 $P < 0.01$ 。

表 2 不同时间移植肺组织 Fas 抗原和 Bcl- 2 表达

分组	例数	免疫表型	
		Fas 抗原	Bcl- 2
冷缺血 3 h(A 组)	15	—	+
冷缺血 6 h(B 组)	15	—	+
再灌注 0.5 h(C 组)	18	++	—
再灌注 1.5 h(D 组)	18	++	—

2.3 电镜观察

超微结构的观察能更早地发现细胞形态学的改变。电镜下肺泡上皮形态变化一般出现在灌注保存后 2、3 h 时可看到较多细胞肿胀,表面微绒毛减少或消失,线粒体肿胀,部分嵴断裂,个别细胞可出现早期凋亡的改变,如细胞核染色质浓缩、边集等。6 h 时就可见到比较明显的超微结构改变,肺泡上皮灶性脱落,但凋亡细胞数量增加尚不明显,间质电子密度降低(水肿),肺泡壁毛细血管内皮细胞肿胀,少数有脱落现象,基底膜基本完整,气-血屏障增宽。

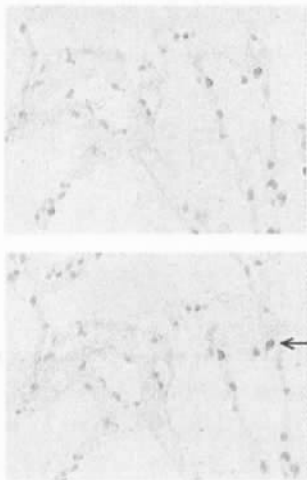


图 1 冷缺血 6 h (B 组), 见少量肺泡上皮凋亡, 凋亡的细胞核呈棕黄色, TUNEL 标记 POD $\times 400$

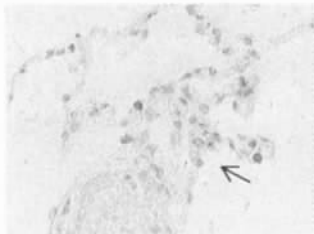


图 2 再灌注 1.5 h (D 组), 可见肺泡上皮凋亡, 凋亡的细胞核呈棕黄色, TUNEL 标记 POD $\times 400$

再灌注后 0.5 h, 部分肺泡有塌陷, 塌陷区肺泡上皮明显肿胀, 部分脱落, 细胞器肿胀, 细胞核常染色质—异染色质结构消失, 染色质凝集, 呈凋亡细胞特征, 血管内皮细胞肿胀、脱落。再灌注后 1.5 h, 上皮细胞凋亡明显增加。

3 讨论

近年来的研究表明, 在肝、肾、心、肺及小肠等移植后缺血再灌注损伤期, 移植物细胞凋亡数量明显增加, 有文献认为大量组织细胞凋亡可能是导致移植失败的原因之一^[2~5]。本实验结果显示肺移植后恢复血液灌注 0.5 h 后即有肺泡上皮细胞凋亡出现, 并且随时间延长而进行性增加, 凋亡细胞的数目与再灌注时间呈正相关, 与文献报道一致^[6]。据文献认为, 在一定的再灌注时间段内, 细胞凋亡数量是呈进行性增加的, 一般在再灌注后 2 h 达高峰, 随后即使延长再灌注时间, 细胞凋亡逐渐减少的, 且再灌注后的肺功能与细胞凋亡的数量无关^[7]。本实验为人体肺移植, 再灌注后 2 h 的标本较难取到, 但 A 和 B 组在冷缺血保存 3~6 h 时仅有少数凋亡细胞, 提示其后出现的凋亡指数增高是由缺血再灌注引起, 说

明肺泡细胞凋亡是肺缺血再灌注早期肺损伤的一个指标^[8]。文献还认为不同器官移植后发生的凋亡及出现高峰时间不尽相同。

细胞凋亡是受许多基因控制的主动死亡过程, Fas 抗原 (CD₉₅) 是一种细胞膜受体, 存在于肺泡上皮中, Fas 抗原与 Fas 配体结合是引起细胞凋亡的途径之一。本实验中冷缺血保存的 A 和 B 组中均未见明显 Fas 抗原表达, 可能是因为低温灌注及保存使肺泡上皮细胞代谢暂时处于一种“休眠”状态, 因而蛋白质合成减少, Fas 抗原水平较低而难以检测到, 随着有氧灌注及组织复温, Fas 抗原表达逐步增强, 同时肺泡上皮的凋亡也明显增加, 提示 Fas 抗原促进了肺泡上皮细胞的凋亡。

Bcl-2 是首个被确认有并与凋亡关系最为密切的凋亡抑制基因, 实验证明 bcl-2 基因产物对核酸内切酶具有明显的抑制作用, 抑制细胞凋亡和 DNA 断裂, COOKE 等在同基因肺移植老鼠的供肺中, 通过气管内腺病毒给出药转染人类 Bcl-2 抗凋亡基因, 证实能减低激活 caspase 的活性及减少 IL-1 β 的生成, 抑制缺血再灌注损伤, 保护移植后的肺功能^[9]。本实验显示肺移植在缺血/再灌注损伤过程中, 随着肺泡上皮凋亡细胞的逐渐增多, Bcl-2 表达逐渐降低, 抑制细胞凋亡作用减弱。

本实验结果提示 Fas 抗原和 Bcl-2 共同参与了肺缺血再灌注损伤, 而且再灌注后 Fas 抗原上升和 Bcl-2 下调是促进凋亡的重要因素。本实验发现细胞凋亡在肺移再灌注损伤早期即可发生, 再灌注 1.5 h 便出现较多的凋亡细胞, 细胞凋亡可能是肺移植再灌注损伤早期的主要表现。

由于细胞凋亡是一个基因调控的程序性细胞死亡, 这就为通过一些干预性措施如基因治疗, 来调节移植器官内的这种细胞死亡提供了可能性, 从而提高移植后功能的迅速恢复。

参 考 文 献:

- [1] 王 巍, 黄慧强, 管忠震. Bcl-2 和整合素 $\alpha 3$ 蛋白在非小细胞肺癌中的表达及临床意义[J]. 中国癌症杂志, 2004(14): 226-233.
- [1] WANG W, HUANG HQ, GUAN ZZ. Expression and clinical significance of Bcl-2 and interin- $\alpha 3$ protein in no small cell lung cancer[J]. China Journal of Cancer, 2004(14): 226-233. Chinese
- [2] AZUARA D, SOLA A, HOTTER G, et al. Role of nitric oxide

(下转第 1753 页)

力的限制,在现行体制下如何整合PBL教学是实施的关键。首先,现行的教材均是按照传统教学方法编写,并不适合PBL教学模式使用。因此,组织富有临床及教学经验的教师编写符合PBL教学模式的教学资料和病例就尤为重要。目前已经有好多项控制病例设计质量的相关研究,其中荷兰的DLANA教授等^[4]提出了以下7条原则:病例的内容应很好的与学生们以前所学习的知识进行衔接;应该包含几条激励学生详细阐述的线索;病例最好呈现在与今后工作内容相关的情景中;在临床问题的情境中呈现有关基础学科的原理,以此来促进知识的整合;应该通过鼓励学生提出学习问题和引导他们查找文献来促进自导性学习;应该通过可能的不断讨论解决问题方法和促进学生探寻其他解决问题的方法来 提高学生在重要知识点上的兴趣;应该与老师一个或多个教学目标相匹配。本教研室组织具有10年以上临床教学经验教师,结合上述设计原则编写出小儿呼吸系统及泌尿系统疾病两个章节的教学资料,能够较全面的涵盖教学重点。在此基础上,针对学生可能提出的问题和教学重点,编写出一份教师指南,取得了一定效果。调查问卷中91%的学生认为所使用的教材资料有助于学习、探索新知识。其次,从传统教学模式向以学生为中心教学方法的转化,需要教师和学生两方面角色发生转变。在开展PBL教学之前,请有经验的学者给指导教师讲解PBL教学法现状及如何开展PBL教学等方面内容,同时对学生也进行PBL教学宣教和动员,让学生对新的教学方法有足够的了解,从而为顺利实施PBL

教学打好基础^[5]。再次,在施行PBL教学模式下若依然延续传统教学的评价体系来检查学习效果似乎不妥。因此,如何建立一个科学量化的PBL教学评价体系对于科学客观地评价PBL教学效果至关重要。

“授之以鱼,莫若授之以渔”,打破传统的灌输式教学方式,将PBL教学更好地整合到传统教学中去,最大限度地发挥其教学优势,解决业已存在的问题与困惑将是整个医学教育界需要着重探讨的问题。

参 考 文 献:

- [1] 刘忠秀.医学教育中PBL教学模式应用的探讨[J].中国高等医学教育,2008(1):15-16.
- [2] LIU ZX. Investigating application of PBL-teaching mode in medical education[J]. Senior Medical Education of China, 2008(1): 15-16. Chinese
- [3] 《本科全球医学教育标准》.世界医学教育联合会(WFME),2001.
- [4] Criteria of global medical education in under graduate course. China Federation of Medical Education (WFME), 2001. Chinese
- [5] SAMY A. Azer. Becoming a student in a PBL course: twelve tips for successful group discussion[J]. Medical Teacher, 2004, 26(1): 12-15.
- [6] DLANA HJM, DOLMAN HETTY, SNELLEN-BALENDONG. Seven principles of effective case design for a problem-based curriculum[J]. Medical Teacher, 1997, 19(3): 185-189.
- [7] 罗 钢,姜红堃.儿科学开展以问题为基础的学习教学法的关键问题[J].中国现代医学杂志,2006,16(16):2547-2548,2550.
- [8] LUO G, JIANG HK. Key problems of problem-based learning in pediatric teaching[J]. Journal of China Modern Medicine, 2006, 16(16): 2547-2548, 2550. Chinese

(曾文军 编辑)

(上接第1741页)

- in apoptosis and cell necrosis for intestinal transplantation [J]. Transplant Proc, 2003, 35(5): 1931-1932.
- [3] LIU J, YAGI T, SADAMORI H, et al. Annexin V assay-proven antiapoptotic effect of ascorbic acid 2-glucoside after cold ischemia /reperfusion injury in rat liver transplantation [J]. Acta Med Okayama, 2003, 57(5): 209-216.
 - [4] KATORI M, BUELOW R, KE B, et al. Heme oxygenase-1 overexpression protects rat hearts from cold ischemia /reperfusion injury via an antiapoptotic pathway[J]. Transplantation, 2002, 73(2): 287-292.
 - [5] STAMMBERGER U, GASPART A, HILLINGER S, et al. Apoptosis induced by ischemia and reperfusion in experimental lung transplantation[J]. Ann Thorac Surg, 2000, 69(5): 1532-1536.
 - [6] FISCHER S, CASSIVI SD, XAVIER AM, et al. Cell death in human lung transplantation: apoptosis induction in human lungs

during ischemia and after transplantation [J]. Ann Surg, 2000, 231: 424-431.

- [7] FISCHER S, DE PERROT M, LIU M, et al. Interleukin 10 gene transfection of donor lungs ameliorates posttransplant cell death by a switch from cellular necrosis to apoptosis [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2003, 126: 1174-1180.
- [8] 张 赛,陈如坤,林 敏,等.大鼠肺缺血再灌注损伤中肺泡细胞凋亡的动态观察[J].中华医学杂志,2004,84(19):1597-1600.
- [9] ZHANG S, CHEN RK, LIN M, et al. Dynamic state observation of apoptosis of pneumocytes in ischemia / reperfusion injury of rat lung[J]. Chin Med, 2004, 84(19): 1597-1600. Chinese
- [10] COODE DT, HOYT EG, ROBBINS RC. Overexpression of human Bcl-2 in syngeneic rat donor lungs preserves posttransplant function and reduces intragraft caspase activity and interleukin-1 beta production[J]. Transplantation, 2005, 79(7): 762-767.

(曾文军 编辑)