

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)07-0618-03

缺血预处理对大鼠缺血再灌注小肠能量代谢、Bcl-2 和 Bax 表达的影响

刘新刘欣 (广东医学院附属医院麻醉科 广东湛江 524001)

Effect of ischemic preconditioning on energy metabolism and expressions of Bcl-2 and Bax in ischemia/reperfusion of rat small intestine

LIU Xin, LIU Xin

Department of Anesthesiology, Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang 524001, China

【Abstract】 AIM: To study the effect of ischemic preconditioning on cell apoptosis following acute intestinal ischemia/reperfusion in rats and explore their relationship. **METHODS:** Thirty-six SD rats were randomized into 3 groups each consisting of 12 rats: sham-operated control group (C group), ischemic reperfusion group (I/R group, the anterior mesenteric artery occlusion for 60 min followed by reperfusion for 120 min), ischemic preconditioning group (IPC-I/R, clamping the anterior mesenteric artery for 10 min followed by unclamping it for 10 min, all for 4 times before I/R). Immunohistochemistry was used to detect the expressions of Bcl-2 and Bax. Twenty-four fields of vision were selected in each group to determine A value. TUNEL method was applied to detect apoptotic intestinal cells, and to calculate the apoptotic index. **RESULTS:** The contents of ATP in C and IPC-I/R groups were significantly higher than that in I/R group ($P < 0.05$). The A value of Bcl-2 in I/R group was remarkably lower than that in C group ($P < 0.05$), and the A value of Bcl-2 in IPC-I/R group was obviously higher than those in C and I/R groups ($P < 0.01$); the A value of Bax in I/R group was significantly higher than those in C and IPC-I/R groups ($P < 0.01$), and the A value of Bax in IPC-I/R group was remarkably higher than that in C group ($P < 0.05$). Compared with that in C group, the apoptotic indexes in I/R and IPC-I/R group were significantly higher ($P < 0.01$ and $P < 0.05$); compared with that in I/R group, the apoptotic index in IPC-I/R group was significantly lower ($P < 0.01$). **CONCLUSION:** Ischemic preconditioning can curb ATP degeneration, enhance the expression of Bcl-2, decrease the expression of Bax, inhibit the apoptosis following small intestinal ischemic reperfusion.

【Keywords】 small intestine; preconditioning; ischemic reperfusion; apoptosis; gene

收稿日期 2005-08-19; 接受日期 2005-10-17

作者简介 刘新, 硕士, 副主任医师. Tel (0759) 2387429 Email:

Liuxin@gdmc.edu.cn

【摘要】目的 探讨缺血预处理对小肠细胞能量代谢和凋亡基因 *bcl-2* *bax* 表达的影响及它们与肠细胞凋亡的内在联系。方法 健康 SD 大鼠 36 只, 雌雄不限, 随机分为 3 组: 空白对照组 (C 组)、缺血预处理组 (IPC-I/R 组) 和缺血再灌注组 (I/R 组), 每组 12 只。按 Murry 法制备缺血预处理模型, I/R 组用血管钳夹闭肠系膜前动脉 1 h, 再灌注 2 h, IPC-I/R 组用血管钳夹闭肠系膜前动脉 10 min 松开 10 min, 反复 4 次, 余同 I/R 组。高效液相色谱法测定 ATP、ADP 含量, 免疫组化检测 Bcl-2 及 Bax 蛋白的表达, 每组选 24 个视野分别测量 A 值。TUNEL 法检测凋亡的小肠细胞并计算凋亡指数。结果 C 组和 IPC-I/R 组 ATP 含量高于 I/R 组 ($P < 0.05$); IPC-I/R 组 Bcl-2 A 值高于 C 组和 I/R 组 ($P < 0.01$), I/R 组 Bcl-2 A 值低于 C 组 ($P < 0.05$); I/R 组 Bax A 值明显高于 C 组和 IPC-I/R 组 ($P < 0.01$), 且 IPC-I/R 组高于 C 组 ($P < 0.05$); 与 C 组比较, I/R 组和 IPC-I/R 组凋亡指数较高 ($P < 0.01$, $P < 0.05$); 与 I/R 组相比, IPC-I/R 组凋亡指数较低 ($P < 0.01$)。结论 缺血预处理能在一定程度上延缓 ATP 降解并调控 Bcl-2 及 Bax 蛋白的表达, 抑制缺血再灌注介导的小肠细胞凋亡。

【关键词】 小肠 缺血预处理 缺血再灌注 细胞凋亡 基因

【中图分类号】 R657.3 **【文献标识码】** A

0 引言

肠缺血再灌注损伤广泛见于临床, 是导致多脏器功能障碍的重要原因。研究表明, 凋亡是其损伤的主要方式, 与细胞的能量代谢和凋亡基因的蛋白表达有关。缺血预处理 (ischemic preconditioning, IP) 对缺血再灌注小肠有较好的保护作用^[1-2], 但它对细胞凋亡的影响研究较少。我们通过大鼠小肠缺血预处理模型, 从细胞凋亡的角度探讨缺血预处理对小肠细胞凋亡基因 *bcl-2* 和 *bax* 表达的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 Bcl-2 mAb, Bax mAb, S-P 试剂盒、原位细胞凋亡检测试剂盒 (均为 Santa Cruz 公司产品, USA); ATP, ADP 标准品 (Sigma 公司, USA)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与模型制备 健康 SD 大鼠 36 只 (由武汉大学实验动物中心提供), 体质量 225 ~ 275 g, 雌雄不限。随机分为空白对照组 (C 组)、缺血再灌注组 (I/R 组) 和缺血预处理组 (IPC-I/R 组)。术前

12 h 禁食不禁水 20% 氨基甲酸乙酯 1 g/kg 腹腔注射麻醉 腹中线切开 找到肠系膜前动脉 C 组不夹闭肠系膜前动脉 I/R 组用血管钳夹闭肠系膜前动脉 1 h 再灌注 2 h IPC-I/R 组依据 Wu 等^[3]方法 用血管夹夹闭肠系膜前动脉 10 min 松开 10 min 反复 4 次 余同 I/R 组 三组均于手术开始时分别经股静脉输注生理盐水 20 μ L/g 手术过程中均面罩给氧 (FiO₂ = 33%) 术毕放血处死 距回盲部 20 cm 取回肠组织 2 cm 用现配多聚甲醛液固定 24 h 做 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达及细胞凋亡检测。

1.2.2 观察指标及方法 ① 小肠组织 ATP、ADP 含量: 各组距回盲部 20 cm 取回肠组织 0.5 g 置液氮保存 用高效液相色谱法测定 ATP、ADP 含量。② 免疫组化检测 *bcl-2* 及 *bax* 基因的表达 (S-P 法): 石蜡切片脱蜡至水 30 mL/L H₂O₂ 孵育 10 min 以消除内源性过氧化物酶的活性 蒸馏水冲洗 PBS 浸洗 5 min; 加正常山羊血清封闭液以消除背景非特异性染色 分别滴加兔抗 Bax、Bcl-2 ρ -myc 蛋白 mAb/pAb (每张切片仅加一种抗体) 37°C 孵育 1 h 滴加生物素标记羊抗兔 IgG 37°C 孵育 15 min 滴加辣根酶标记链霉卵白素 37°C 孵育 15 min 上述三步均 PBS 洗 5 min \times 3 次 DAB 显色 自来水充分冲洗 苏木素复染 封片。阴性对照以 PBS 代替一抗孵育 其他步骤相同 阳性对照用已知的阳性标本 在显微镜 400 倍下用 HPIAS-1000 医学彩色图像分析系统测量 A 值 每组选 24 个视野 (每组 12 只大鼠各取 1 张切片 每张切片取 2 个视野) 分别测量 计算 A 值的均数作为此组的代表值 ③ TUNEL 法检测凋亡细胞: 二甲苯脱蜡 梯度乙醇入水 切片浸泡于柠檬酸盐缓冲液 (pH = 6) 置医用微波炉 92 ~ 98°C 中处理 15 min 取出后室温冷却 1:5 小牛血清 20 μ L 封闭非特异反应 37°C 孵育 15 min 3 mL/L H₂O₂ 孵育 10 min 以消除内源性过氧化物酶的活性 POD 20 μ L 37°C 孵育 30 min 上述 5 步均以 10 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH = 7.4) 洗 5 min \times 3 次 DAB 显色 自来水充分冲洗 苏木素复染 封片 每张切片于 40 倍目镜下随机取 5 个视野 每组共 60 个视野 计算凋亡指数 (apoptotic index, AI), AI = 凋亡细胞数目/总细胞数目 \times 100%。

统计学处理: 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示 应用 SPSS 10.0 软件进行单因素方差分析 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ATP、ADP 含量 C 组和 IPC-I/R 组 ATP 含量高于 I/R 组 ($P < 0.05$) ADP 含量各组无显著性差异

(表 1)。

2.2 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达 I/R 组 Bcl-2 A 值低于 C 组 ($P < 0.05$) IPC-I/R 组 Bcl-2 A 值高于 C 组和 I/R 组 ($P < 0.01$); Bax A 值 I/R 组明显高于 C 组和 IPC-I/R 组 ($P < 0.01$) 且 IPC-I/R 组高于 C 组 ($P < 0.05$ 表 1)。

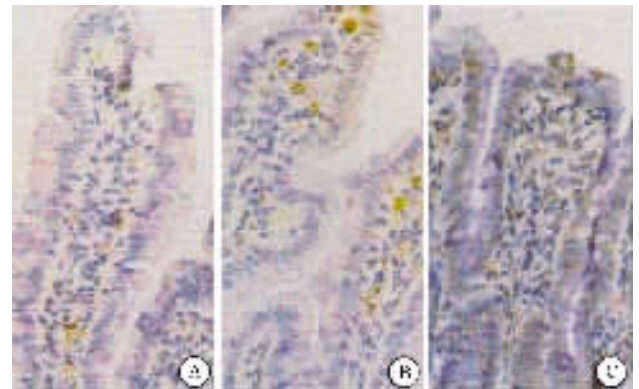
2.3 TUNEL 法检测小肠细胞凋亡 与 C 组比较 I/R 组和 IPC-I/R 组 AI 较高 ($P < 0.01$ $P < 0.05$) 与 I/R 组相比 IPC-I/R 组 AI 较低 ($P < 0.01$ 表 1)。

表 1 三组 ATP、ADP 含量 (μ mol/g 湿质量) Bcl-2、Bax 蛋白表达及 AI 的比较 ($n = 12, \bar{x} \pm s$)

组别	ATP	ADP	Bcl-2(A)	Bax(A)	AI
C	1.76 \pm 0.38	0.25 \pm 0.04	0.08 \pm 0.03	0.12 \pm 0.02	4.3 \pm 1.1
I/R	0.94 \pm 0.15 ^a	0.28 \pm 0.06	0.06 \pm 0.02 ^a	0.20 \pm 0.04 ^b	26.5 \pm 1.8 ^b
IPC-I/R	1.56 \pm 0.40 ^a	0.27 \pm 0.06	0.14 \pm 0.03 ^{bd}	0.13 \pm 0.02 ^{ad}	5.9 \pm 1.5 ^{ad}

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs C 组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs I/R 组。C 对照组 I/R 缺血再灌注组 IPC-I/R 缺血预处理组 ATP: 三磷酸腺苷; ADP: 二磷酸腺苷; AI: 凋亡指数。

2.4 三组 TUNEL 凋亡细胞、Bax 及 Bcl-2 阳性细胞表达情况 见图 1 ~ 3。

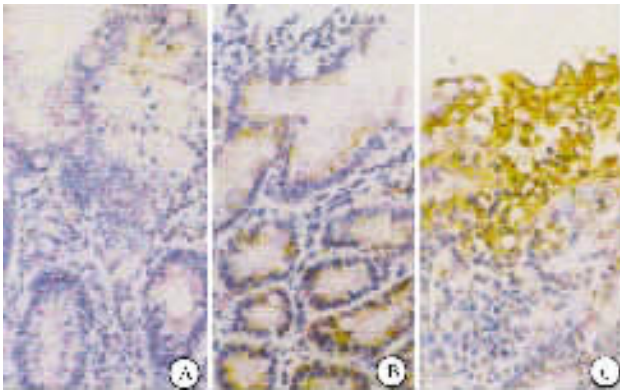


A: 有较少的 Bcl-2 阳性细胞表达; B: 有较少的 Bax 阳性细胞表达; C: 有较少的凋亡细胞阳性表达。

图 1 对照组 Bcl-2、Bax 及 TUNEL 凋亡细胞阳性表达 IH \times 200

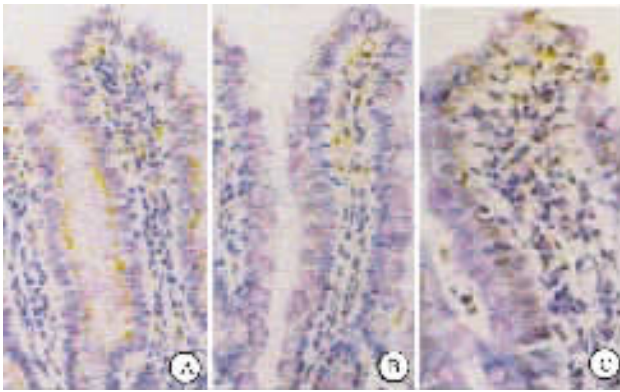
3 讨论

肠 I/R 可因急性失血、休克、严重多发性创伤等因素引起 它可引起肠道和导致远端器官的损伤。IP 可通过增加谷胱甘肽含量和保护 SOD 活性^[4]、减少细菌移位和降低 iNOS 活性^[2]、蛋白激酶 C 和线粒体 K(ATP) 通道开放^[5]以及血红素加氧酶-1 释放^[6]等多种途径保护缺血再灌注小肠 其保护作用的机制尚未完全阐明 目前认为细胞的能量代谢和凋亡也可能占有重要地位 我们采用血管夹夹闭肠系膜前动脉



A: 有较少的 Bcl-2 阳性细胞表达; B: 有较多的 Bax 阳性细胞表达;
C: 有较多的凋亡细胞阳性表达。

图2 缺血再灌注组 Bcl-2, Bax 及 TUNEL 凋亡细胞阳性表达
IH × 200



A: 有较多的 Bcl-2 阳性细胞表达, 表现为间质细胞呈淡黄色连续的细颗粒状; B: 有较少的 Bax 阳性细胞表达; C: 有较少的凋亡细胞阳性表达, 表现为小肠细胞核有不均匀的黄褐色颗粒, 胞浆复染为淡蓝色。

图3 缺血预处理组 Bcl-2, Bax 及 TUNEL 细胞阳性表达 IH × 200

复制肠 I/R 和 IP 模型, 结果显示, 肠 I/R 后, 小肠组织的 ATP 含量和 Bcl-2 蛋白表达均降低, Bax 蛋白表达及 AI 显著增加; 而 IP 后肠 I/R, ATP 含量和 Bcl-2 蛋白表达增加, Bax 蛋白表达及 AI 降低, 提示凋亡及其相关因素参与了缺血再灌注损伤, IP 对缺血再灌注损伤有保护作用。

线粒体是细胞重要的细胞器之一, 它除了产生 ATP 供能外, 在细胞氧化还原状态和渗透压调节、钙稳态和 pH 维持以及细胞信号转导中起重要作用。细胞无论坏死或凋亡线粒体都要经历诱导、效应、降解阶段。ATP 对线粒体通透性转换后细胞走向坏死还是凋亡有重要意义, ATP 耗竭走向坏死, 否则走向凋亡。研究表明^[7], IP 后, 组织可产生“缺血、再灌注耐受”, 需能和代谢降低, 氧自由基、活化中性粒细胞释

放和细胞凋亡减少。我们研究发现, 肠缺血再灌注后, AI 显著增加可能与 ATP 含量降低有关, 而 IP 后, ATP 含量变化不大, 可能与能量需要和代谢降低有关。

Bcl-2 表达水平与细胞寿命呈正相关, 因此 Bcl-2 又称为“生存基因”。Bax 属 Bcl-2 基因家族, 在高浓度时可启动细胞死亡, 低浓度时可使细胞器释放出某些分子, 引起半胱氨酸蛋白酶的活化。Bcl-2 基因家族通常以二聚体的形式发挥作用, Bax/Bcl-2 异二聚体可促进细胞凋亡, 而 Bcl-2/Bcl-2 同二聚体可结合于线粒体内膜稳定其通透性, 以防止细胞凋亡的末端效应子半胱氨酸蛋白酶(Caspases)的激活。我们实验发现 I/R 组 Bax 蛋白表达明显高于 C 组和 IPC-I/R 组, 与肠黏膜损伤和 AI 变化一致, 说明缺血再灌注肠细胞凋亡是 Bax 介导的, 且 IP 能降低缺血再灌注肠细胞 Bax 蛋白表达。而 IPC-I/R 组 Bcl-2 蛋白表达明显高于 I/R 组和 C 组, 说明 I/R 在一定程度上可增加 Bcl-2 蛋白表达, 与 Cinel 等^[1]报道一致。总之, 尽管 IP 可通过多种途径保护缺血再灌注小肠, 但部分可能与减少 ATP 降解、增加 Bcl-2 蛋白表达和降低 Bax 蛋白表达有关, 其具体机制有待进一步研究。

【参考文献】

- [1] Cinel I, Avlan D, Cinel L, et al. Ischemia preconditioning reduce intestinal epithelial apoptosis in rats[J]. Shock, 2003, 19(6): 588-592.
- [2] Aksoyek S, Cinel I, Avlan D, et al. Intestinal ischemic preconditioning protects the intestine and reduce bacterial translocation[J]. Shock, 2002, 18(5): 476-480.
- [3] Wu B, Ootani A, Iwakiri R, et al. Ischemic preconditioning attenuates ischemia-reperfusion induced mucosal apoptosis by inhibiting the mitochondria-dependent pathway in rat small intestine[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004, 286(4): G580-587.
- [4] Ferencz A, Szanto Z, Borsiczky B, et al. Effect of ischemic preconditioning on the oxidative stress in small bowel autotransplantation[J]. Surgery, 2002, 132(5): 877-884.
- [5] Wang YP, Maeta H, Mizoguchi K, et al. Intestinal ischemia preconditioning myocardium: Role of protein kinase C and mitochondrial K(ATP) channel[J]. Cardiovasc Res, 2002, 55(3): 576-582.
- [6] Tamion F, Richard V, Lacoume Y, et al. Intestinal preconditioning prevents systemic inflammatory response in hemorrhagic shock. Role of HO-1[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002, 283(2): 408-414.
- [7] Pasupathy S, Homer-Vanniasinkam S. Ischaemic preconditioning protects against ischaemia/reperfusion injury: Emerging concepts[J]. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2005, 29(2): 106-115.