文章编号:1000-5404(2005)14-1471-03

论著

缺氧预处理对L02肝细胞缺氧复氧损伤的抗凋亡保护作用

邹忠东[1],王 瑜[1],王 烈[1],刘庆宏[2],姚和祥[1] (南京军区福州总医院:[1]普通外科,[2]病理科,福州 350025)

提 要:目的 研究缺氧预处理对正常肝细胞株L02缺氧复氧损伤的抗凋亡细胞保护机制。**方法** 建立缺氧预处理细胞模型,随机分为正常对照组、缺氧复氧损伤组(hypoxia reoxygenation,H/R组)和缺氧预处理组(hypoxic precondition,H/P组)。使用流式细胞术,检测细胞缺氧复氧处理后1、6、12、18、24 h细胞凋亡率,并分别检测各组细胞缺氧复氧处理后12 h时bcl-2、bcl-xl、bax和P53蛋白的表达量,同时通过透射电镜观察细胞超微结构变化。**结果** H/P组和H/R组比较,细胞凋亡率显著下降,bcl-2、bcl-xl蛋白表达显著升高,P53、bax蛋白表达量显著降低,透射电镜下可见细胞结构基本维持正常。**结论** 缺氧预处理对缺氧复氧导致的L02肝细胞损伤有明显的保护作用。肝缺氧预处理过程中,bcl-2、bcl-xl、bax及P53蛋白参与了细胞凋亡调控作用。

关键词:缺氧预处理;缺氧复氧;流式细胞术;调亡
中图法分类号:R322.47;R329.25;R459.9 **文献标识码**:A

Anti-apoptotic effect of hypoxia pretreatment on liver cell line L02 of hypoxia/reoxygenation injury

ZOU Zhong-dong[1], WANG Yu[1], WANG Lie[1], LIU Qing-hong[2], YAO He-xiang[1] ([1]Department of General Surgery, [2]Department of Pathology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Area Command, Fuzhou 350025, China)

Abstract: Objective To elucidate the anti-apoptotic mechanism of hypoxia precondition on liver cell line L02 of hypoxia/reoxygenation injury *in vitro*. **Methods** L02 cells were randomly divided into the following groups: Control (C), hypoxia/reoxygenation (H/R) and hypoxia precondition (H/P). Cell model of hypoxia/reoxygenation was established in the H/R and H/P groups. The apoptotic rate was detected by flow cytometry at 1st, 6th, 12th, 18th, 24th hour after hypoxia/reoxygenation was performed and at 12th hour, the expression of apoptosis-related proteins like Bcl-2, Bcl-xl, Bax and P53 in liver cell line L02 was detected. The cellular ultrastructure was observed by using transmission electron microscope. **Results** As compared with H/R group, the apoptotic ratio of H/P group decreased significantly ($P<0.05$), while the expression of Bcl-2, Bcl-xl increased and the expression of P53, Bax dropped significantly. The cellular ultrastructure was basically normal. **Conclusion** Hypoxia precondition has significant protective effect on L02 cells of hypoxia/reoxygenation injury. During hypoxia precondition of liver, the apoptosis-related proteins such as Bcl-2, Bcl-xl, Bax and P53 involve in the regulation of cell apoptosis.

Key words: hypoxia precondition; hypoxia reoxygenation; flow cytometry; apoptosis

目前研究证实,不同种属和不同的器官组织都存在这种内源性保护现象[1]。本研究通过建立体外缺血预处理肝细胞模型,使用流式细胞术检测细胞凋亡率,细胞内bcl-2、bcl-xl、bax和P53蛋白的表达,同时观察电镜下细胞形态的变化,旨在探讨缺氧(血)预处理对正常肝细胞株L02缺氧复氧(缺血再灌注)损伤致凋亡的保护作用,缺氧预处理对细胞bcl-2、bcl-xl、bax和P53蛋白表达的影响[2]。

1 材料与方法

1.1 材料

正常人肝细胞株L02(中国医学科学院上海细胞所)。鼠抗人bcl-2、bcl-xl、bax及P53单克隆抗体(美国Sigma公司);FITC标记的兔抗鼠IgG(美国Santa Cruz公司)。流式细胞仪FACScan(美国Beckman Coulter公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 以含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基培养。模拟缺氧(血),即用混合气(90% N_2 + 8% CO_2 + 2% H_2)饱和KHH平衡盐溶液,测血气 $PO_2 \leq 4$ kPa,在厌氧培养箱(90% N_2 + 8% CO_2 + 2% H_2)中培养[3];模拟复氧(血),既缺血再灌注,KHH平衡盐溶液用高浓度 O_2(85% O_2 + 15% CO_2)饱和,测血气 $PO_2 \geq 13$ kPa。用模拟缺氧液置换正常培养液即为缺氧,再用模拟再灌注液置换缺氧液即为再灌注。缺氧复氧组(hoxia reoxygenation,H/R),缺氧培养6 h,而后复氧培养。缺氧预处理组(hypoxic precondition, H/P),缺氧预处理,既细胞缺氧培养10 min,复氧培养10 min,共3个循环后,随后处理同H/R组。以未经处理的为正常对照组。

作者简介:邹忠东(1968-),男,江苏省丹阳市人,硕士,主治医师,主要从事肝胆胰腺疾病方面的研究,发表论文5篇。电话:(0591)22859415
收稿日期:2005-04-11;修回日期:2005-06-20

1.2.2 Annexin/PI 法检测凋亡细胞 L02 细胞按 2×10^5/ml 接种于60 mm 组织6孔培养板,5 ml/孔,在 37 ℃、5% CO_2 孵箱中分别培养,待细胞长成致密单层后,进行分组处理继续培养,并于培养的1、6、12、18 及 24 h 收集细胞,调节细胞浓度为 5×10^5 ~ 6×10^6/ml,采用 Annexin V/PI 染色,FCM 检测细胞凋亡率。

1.2.3 流式细胞仪检测 bcl-2 、bcl-xl 、bax 和 P53 蛋白表达

培养细胞经分组处理后继续培养,于培养的 12 h 收集细胞,以 0.5% 多聚甲醛固定,0.1% Triton-X 100 增加细胞膜通透性,细胞以 2.5×10^5/300 μl 分管,洗涤,离心,弃上清,各管分别加入鼠抗人 bcl-2 、bcl-xl、bax 及 P53 单克隆抗体,37 ℃孵育 1 h,洗涤离心,各管加入 50 μl 标记 FITC 的兔抗鼠二抗,37 ℃孵育 30 min,洗涤离心,振荡悬于 500 μl PBS 液中,流式细胞仪检测。

1.2.4 流式细胞仪分析 流式细胞仪 FACScan 的发射光为氩离子激光器,发射波长为 488 nm。每管测定10 000个细胞,设同型对照,Lysis Ⅱ 软件分析处理数据,记录阳性细胞百分数。

1.2.5 细胞形态学观察 用 3% 琼脂糖制成中空呈锥形的模具,收集细胞,离心、洗涤,按透射电镜要求制片,常规铅铀双染色,镜下观察。

1.3 统计学处理

各组数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SAS 6.12 统计软件包进行统计处理,两组均数比较用小样本 t 检验。

2 结果

2.1 细胞凋亡率变化

表1 所示,各组细胞在不同时间点使用 Annexin/PI 法检测凋亡细胞凋亡率比较。H/R 组细胞凋亡率随时间延长,逐渐增高,于缺氧复氧处理后 12 h,达到高峰,为(39.7 ± 5.27)%,与 1 h 及 6 h 比较,显著差异($P<0.05$),随后稍有下降。而 H/P 组凋亡率随时间变化不明显,各时间点间比较无差异。H/R 组与其它两组间比较,显著差异($P<0.05$)。

表1 各组正常人肝细胞株 L02 细胞凋亡率变化($n=6$,%,$\bar{x}\pm s$)

Tab 1 The apoptotic rate of liver cell line L02 in different groups ($n=6$,%,$\bar{x}\pm s$)

Group	0 h	1 h	6 h	12 h	18 h	24 h
Control	1.1 ±0.11	1.0 ±0.21	1.7 ±0.34	1.5 ±0.23	1.2 ±0.18	1.4 ±0.22
H/R	0.9 ±0.18	12.1 ±1.32	18.7 ±2.92	39.7 ±5.27 *	31.4 ±4.21	32.6 ±3.56
H/P	0.8 ±0.12	6.3 ±0.93	7.6 ±1.43	6.9 ±0.97◇	6.3 ±1.23	5.5 ±0.76

◇: $P<0.05$, *vs* H/R; *: $P<0.05$, *vs* 1,6,18,24 h in H/R and control group

2.2 细胞 P53 和 bcl-2、bcl-xl 及 bax 蛋白表达的变化

L02 细胞经缺氧复氧后的凋亡时间曲线观察到 12 h 为最高,因此于 12 h 检测 P53 和 bcl-2、bcl-xl 及 bax 蛋白表达。表2 所示,和对照组比较,H/R 组的 P53 和 bax 表达显著增高($P<0.05$),而 bcl-2 和 bcl-xl 的表达则相反($P<0.05$)。和 H/R 组比较,H/P 组 bcl-2 和 bcl-xl 表达明显增高($P<0.05$),而 P53 和 bax 表达显著降低($P<0.05$)。

表2 各组细胞 P53 和 Bcl-2、Bcl-xl 及 Bax 蛋白表达的变化($n=6$,%,$\bar{x}\pm s$)

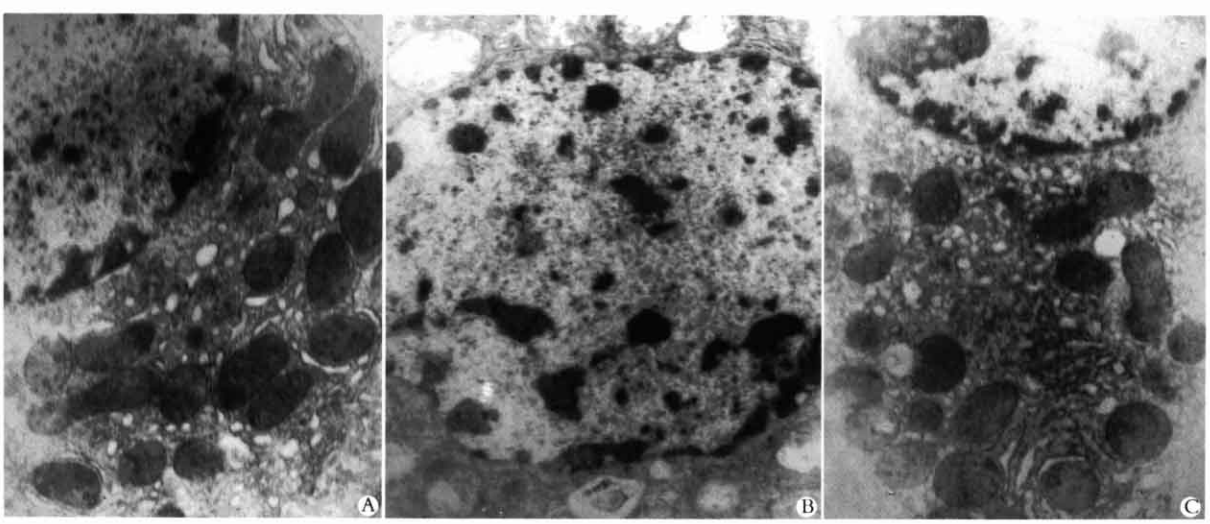
Tab 2 Expression of P53, Bcl-2, Bcl-xl and Bax in liver cell line L02 in different groups ($n=6$,%,$\bar{x}\pm s$)

Group	Bax	Bcl-xl	Bcl-2	P53
Control	76.21 ±9.12	51.23 ±6.66	26.67 ±4.01	22.76 ±3.18
H/R	86.77 ±10.41★	32.65 ±4.24★	15.41 ±1.36★	43.65 ±5.23★
H/P	68.56 ±7.54◆	44.73 ±6.71◆	23.93 ±3.81◆	31.03 ±3.41◆

★: $P<0.05$, *vs* control group; ◆: $P<0.05$, *vs* H/R group

2.3 电镜下肝细胞结构改变

对照组,细胞器结构完整,线粒体排列整齐(图 1A)。H/R 组,细胞膜出现阶段性损伤,线粒体肿胀,外膜模糊,内膜破裂,线粒体嵴明显减少或消失,排列欠规则,部分出现气球样变,粗面内质网呈脱颗粒,核内染色体核边聚现象(图 1B)。H/P 组,细胞膜及各种细胞器的膜结构完整,粗面内质网有大量核糖体附着,线粒体排列正常,少数嵴较模糊,无明显肿胀(图 1C)。



A: Control; B: Hypoxia reoxygenation; C: Hypoxia precondition

图1 电镜下大鼠肝细胞结构改变 (TEM × 10 000)

Fig 1 Ultrastructural changes of liver cell line L02 (TEM × 10 000)

3　讨论

缺血再灌注损伤是多因素的器官损伤病理发生、发展过程，是肝脏移植术后供肝无功能、功能不全的一种重要原因。细胞凋亡是一种受基因精细调控的细胞主动性自杀过程。对肝缺血再灌注损伤机制的研究初步表明，肝缺血再灌注损伤可引起细胞内促凋亡及抑制凋亡基因的表达发生变化，导致细胞凋亡[4]，肝细胞凋亡是肝缺血再灌注损伤中肝细胞死亡的一种方式[5]。在肝缺血再灌注过程中，缺血预处理是否抑制了细胞凋亡的发生，需要进一步证实。本实验建立体外缺血预处理细胞模型，通过检测细胞的凋亡率，细胞内 p53、bcl-2、bcl-xl 和 bax 表达的变化，以及电镜下细胞形态的改变，分析缺血预处理对细胞抗凋亡保护作用机制以及细胞凋亡相关蛋白在保护效应中的作用。本结果显示，与对照组相比，肝细胞在缺氧复氧损伤后，细胞凋亡率明显升高，p53、bax 表达显著增加，bcl-2、bcl-xl 表达明显下调，细胞形态结构出现损伤的表现。缺氧预处理使肝细胞凋亡率明显下降，同时 p53、bax 蛋白表达明显减低，bcl-2、bcl-xl 表达显著升高，肝细胞维持基本正常的结构。结果表明，肝细胞缺氧复氧后引起细胞凋亡可能与 p53、bax 基因激活，上调 p53、bax 蛋白表达有关；缺氧预处理一定程度上抑制肝细胞缺氧复氧损伤诱导的细胞凋亡，与 p53、bcl-2、bcl-xl 和 bax 蛋白表达有关。

缺血再灌注损伤能够诱导细胞凋亡，其凋亡途径可能与线粒体信号通路与死亡受体信号通路有关[6]。p53 基因在基因转录、DNA 修复、基因组稳定性、细胞周期调控和凋亡中均具有重要作用，野生型 p53 基因是缺血再灌注损伤诱导细胞凋亡重要调节基因。bcl-2 蛋白家族与细胞凋亡密切相关，其中包括抑制凋亡蛋白 bcl-2、bcl-xl 等和促凋亡蛋白 bax、bcl-xs 等，分布在线粒体外膜、核膜和内质网膜上[7]。bcl-2、bcl-xl 等细胞凋亡负调因子，在细胞受到外界刺激时能保护细胞免于凋亡。线粒体膜上的 bcl-2 抑制凋亡作用在：bcl-2 能改变线粒体巯基的氧化还原状态来控制其膜电位，阻止细胞内氧化损伤，从而调控细胞凋亡[8]。调节线粒体膜对一些凋亡蛋白前体的通透性。bcl-2 能将凋亡蛋白前体凋亡蛋白酶活化因子（apoptosis protease-activating factor，Apaf）等定位至线粒体膜上，使其不能发挥凋亡作用[9]。一方面 bcl-2 和其家族的促凋亡蛋白 bax 结合形成异源二聚体，减少 bax 同缘二聚体来抑制凋亡的发生[7]；另一方面可能也独立地参与细胞凋亡的调控。缺血预处理中，在 p53、bcl-2、bcl-xl 和 bax 共同作用下对细胞的凋亡进行调控。

本研究表明，在肝移植中缺血预处理抑制缺血再灌注损伤所诱导的肝细胞凋亡，并起到细胞保护作用；初步证明了保护效应与 p53，bax 蛋白表达下调和 bcl-2，bcl-xl 蛋白表达上调有关，但尚需进一步从基因、蛋白和动物水平深入研究其抗缺血再灌注损伤机制。

参考文献：

[1] Eaton P, Fuller W, Bell J R, *et al*. AlphaB crystallin translocation and phosphorylation: signal transduction pathways and preconditioning in the isolated rat heart[J]. J Mol Cell Cardiol, 2001, 33(9): 1659 - 1671.

[2] Murry C E, Jennings R B, Reimer K A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium[J]. Circulation, 1986, 74(5): 1124 - 1136.

[3] Carini R, De Cesaris M G, Splendore R, *et al*. Ischemic preconditioning reduces Na^+ accumulation and cell killing in isolated rat hepatocytes exposed to hypoxia[J]. Hepatology, 2000, 31(1): 166 - 172.

[4] Allal A S, Waelchli L, Brundler M A. Prognostic value of apoptosis - regulating protein expression in anal squamous cell carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(17): 6489 - 6496.

[5] Selzner M, Rudiger H A, Selzner N, *et al*. Transgenic mice overexpressing human Bcl-2 are resistant to hepatic ischemia and reperfusion [J]. J Hepatol, 2002, 36(2): 218 - 225.

[6] Hermann D M, Kilic E, Hata R, *et al*. Relationship between metabolic dysfunctions, gene responses and delayed cell death after mild focal cerebral ischemia in mice[J]. Neuroscience, 2001, 104(4): 947 - 955.

[7] Linjawi A, Kontogiannea M, Halwani F, *et al*. Prognostic significance of p53, bcl-2, and Bax expression in early breast cancer[J]. J Am Coll Surg, 2004, 198(1): 83 - 90.

[8] Das D K, Maulik N. Preconditioning potentiates redox signaling and converts death signal into survival signal[J]. Arch Biochem Biophys, 2003, 420(2): 305 - 311.

[9] Hoehn B, Yenari M A, Sapolsky R M, *et al*. Glutathione peroxidase overexpression inhibits cytochrome C release and proapoptotic mediators to protect neurons from experimental stroke[J]. Stroke, 2003, 34 (10): 2489 - 2494.

（编辑　汪勤俭）