文章编号:1000-5404(2011)17-1831-03

论著

Bcl-2 和 Bax 在小鼠海马发育中的表达变化

邵姝元[1],张敬坤[2],张 莉[2],郭 敏[2] (121001 辽宁 锦州,辽宁医学院:病理生理学教研室[1],组织胚胎学教研室[2])

[摘要] **目的** 探讨 Bcl-2 和 Bax 在小鼠海马发育过程中的表达变化。**方法** 利用免疫组织化学及图像分析技术对小鼠海马发育中 Bcl-2 和 Bax 蛋白进行分析。**结果** Bcl-2 免疫组化结果:胚龄(embryonic day, E) 16 d CA1 区有少量阳性细胞。E18 d,海马各区均可见阳性细胞,以锥体层居多。生后(postnatal day, P)1 ~21 d,海马各区阳性细胞先密集后稀疏,以 P7 d 最密集,CA3 区最密集。P28 d 后趋于稳定。锥体细胞层 Bcl-2 阳性表达细胞的平均光密度(AOD)值先增加后减小,P7 d 为最大值($P<0.01$),P28 d 后趋于稳定($P>0.05$)。Bax 表达结果与 Bcl-2 结果相似。Bcl-2/Bax 比值 E18 d ~ P1 d 逐渐降低($P<0.01$),之后趋于稳定($P>0.05$)。**结论** Bcl-2 和 Bax 在胚胎期和生后早期小鼠海马有高表达,其凋亡高峰是生后 1 d。成年及老年后保持低水平。

[关键词] 海马;Bcl-2;Bax;小鼠
[中图法分类号] R322.81; R329-33; R329.26 [文献标志码] A

Expression of Bcl-2 and Bax in mice developing hippocampus

Shao Shuyuan[1], Zhang Jingkun[2], Zhang Li[2], Guo Min[2] ([1]Department of Pathophysiology, [2]Department of Histology and Embryology, Liaoning Medical College, Jinzhou, Liaoning Province, 121001, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the expression of Bcl-2 and Bax in developing hippocampus of mice. **Methods** Expression of Bcl-2 and Bax in developing hippocampus of mice was detected by immunohistochemistry and image analysis, respectively. **Results** Bcl-2 immunohistochemistry showed a small number of Bcl-2 positive cells in CA1 area on embyronic (E) day 16 and in hippocampus on E d 18, especially in pyramidal layer, which became intensive and then sparse in hippocampus on postnatal (P) days 1 -21, especially in CA3 area on P7 day, which then remained stable from P28 day. The average optical density (AOD) for Bcl-2 positively expressed cells in pyramidal layer increased and reached its peak on P7 day and then decreased($P<0.01$), which remained stable from P28 day($P>0.05$). The findings in Bax immunohistochemistry were similar to those in Bcl-2 immunohistochemistry. The Bcl-2 and Bax ratio decreased gradually from E18 day to P1 d($P<0.01$) and then remained stable($P>0.05$). **Conclusion** Bcl-2 and Bax are highly expressed in embryo and hippocampus of early postnatal mice and reached their peak on P1 day. However, they are lowly expressed in adult and aged mice.

[**Key words**] mouse; hippocampus; Bcl-2; Bax

Corresponding author: Guo Min, E-mail: mguo1118@yahoo.com.cn

海马是脑边缘系统的重要组成部分,其在学习、记忆和内脏活动方面起着极其重要的作用[1]。研究表明,细胞凋亡在海马发育过程中发挥着重要的作用,而 Bcl-2 凋亡调控基因家族中的抑凋亡成员 Bcl-2 和促凋亡成员 Bax 在细胞凋亡过程中发挥着重要的调节作用[2]。本研究应用免疫组织化学和图像分析技术检测 C57/BL6 小鼠海马发育过程中 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达变化,以进一步探讨其在海马发育中的作用机制。

[通信作者] 郭 敏,E-mail: mguo1118@yahoo.com.cn

1 材料与方法

1.1 主要试剂

兔抗小鼠多克隆 Bcl-2 抗体(Santa cruz 公司);兔抗小鼠多克隆 Bax 抗体(Santa cruz 公司);itive™ S-P 超敏试剂盒(兔),(福州迈新生物技术开发有限公司);Ultra Sens 浓缩型 DAB 试剂盒(北京中山金桥生物技术有限公司)。

1.2 动物培养与取材[1]

选用成年健康 C57/BL6 小鼠(体质量 22 ~27 g,90 只,由中国医学科学院实验动物研究所提供),按 1∶2 雌、雄同窝饲养,以观察到阴道栓的最早时间计为胚龄(embryonic day, E)

0 d,观察到仔鼠出生的当天计为生后(postnatal day, P)0 d。选取E10、12、14、16、18、20 d和P1、3、5、7、14、21、28 d的仔鼠及生后2、3、6、12、15、18个月的成鼠,每组8只。E10、12、14 d的胎鼠取全胚,其余时间段动物断头取脑,4%多聚甲醛固定,常规脱水透明,石蜡定向包埋。制作5 μm厚的连续切片,等间隔选取切片。

1.2 免疫组织化学染色

石蜡切片脱蜡水化后,微波修复10 min,滴加3% H_2O_2室温孵育10 min,滴加非免疫动物血清室温孵育10 min,加一抗(兔抗小鼠多克隆抗体,Bcl-2 1∶200, Bax 1∶100,Santa Cruz公司)4 ℃过夜,滴加生物素标记的二抗(山羊抗兔IgG,1∶200,北京中杉金桥生物有限公司)室温孵育10 min,滴加链霉菌抗生物素-过氧化物酶溶液室温孵育10 min,DAB显色,苏木精复染核,脱水、透明、封片。PBS代替一抗作阴性对照。

1.3 图像分析

用Image-Pro Plus 6.0图像分析系统对Bcl-2和Bax在海马阿蒙角(Ammon's horn,CA)锥体细胞层的阳性表达进行分析。每个样本等间隔选取5张切片,每张切片于400倍光镜下系统随机选取3个视野测量,计算平均光密度值(average optical density,AOD)。

1.4 统计学分析

数据用$\bar{x} \pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件,各时间点间的差别比较采用重复测量设计资料的方差分析。

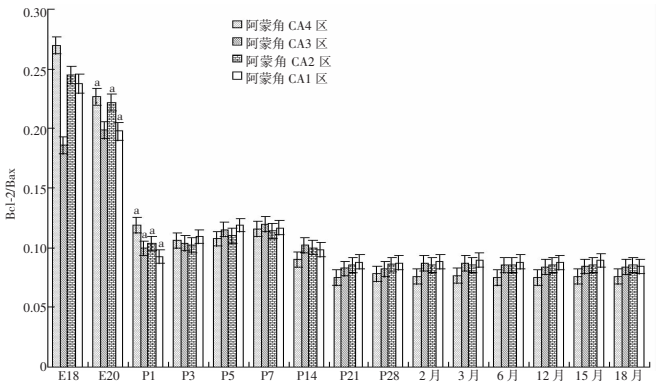
2 结果

2.1 免疫组化染色

Bcl-2阳性反应物呈棕黄色颗粒状,主要表达于细胞质。E12 d出现仅由复层室周神经上皮构成的海马原基,无阳性细胞表达。E14 d室周神经上皮层内侧出现边缘层,但仍无阳性细胞表达。E16 d CA1区可见少量阳性细胞,以海马板层略多。E18 d,海马各区均可见阳性细胞,以锥体层居多。其中CA3区最密集,CA1区最稀疏。P1 d~P7 d,各区阳性细胞更加密集,染色增强,以CA3区最密集。P14 d~P21 d,各区阳性细胞渐稀疏,染色变浅,CA3区最密集,CA1区最稀疏。P28 d后趋于稳定(图1)。Bax阳性反应物也呈棕黄色颗粒状,主要表达于细胞质,其分布规律与Bcl-2相似(图2)。

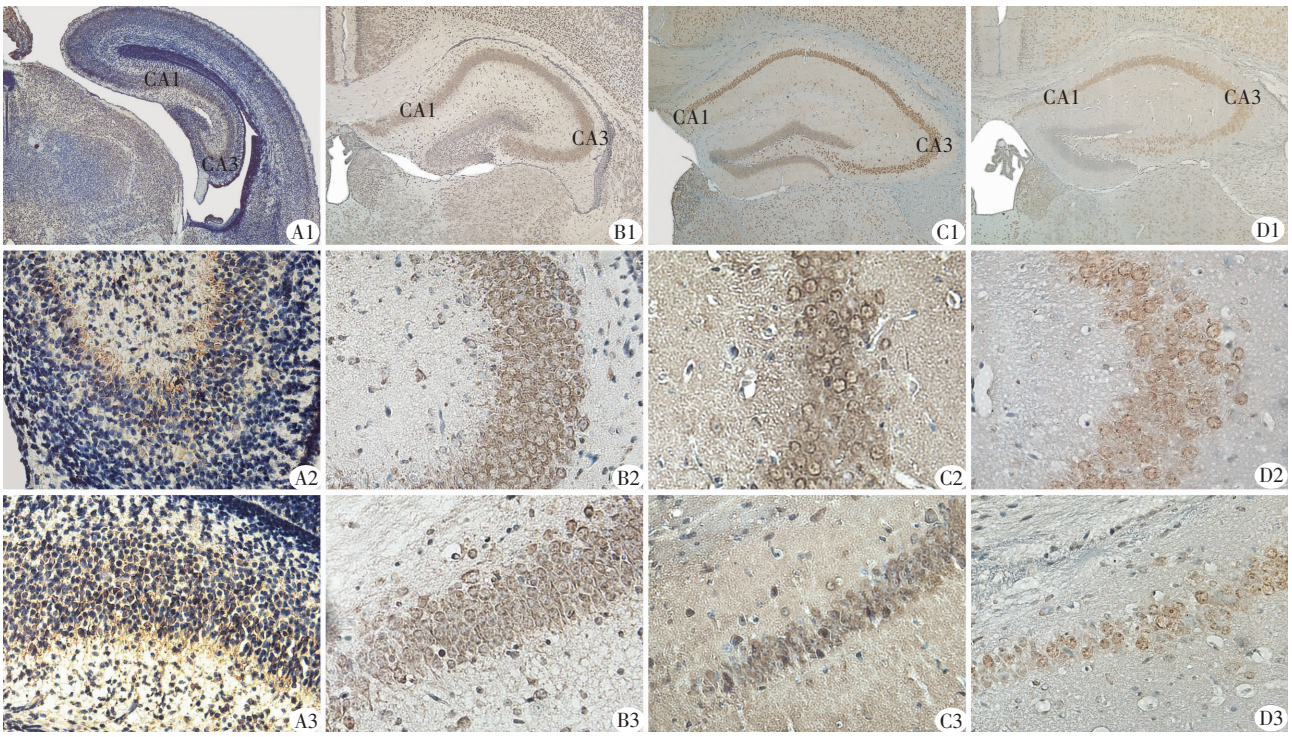
2.2 图像分析结果

CA1~4区锥体细胞层Bax和Bcl-2图像分析显示:AOD值E18 d~P21 d均先增加后减小,P7 d为最大值($P<0.01$),P28 d后趋于稳定($P>0.05$)。Bcl-2/Bax比值E18 d~P1 d降低($P<0.01$),P3 d后趋于稳定($P>0.05$),见图3。



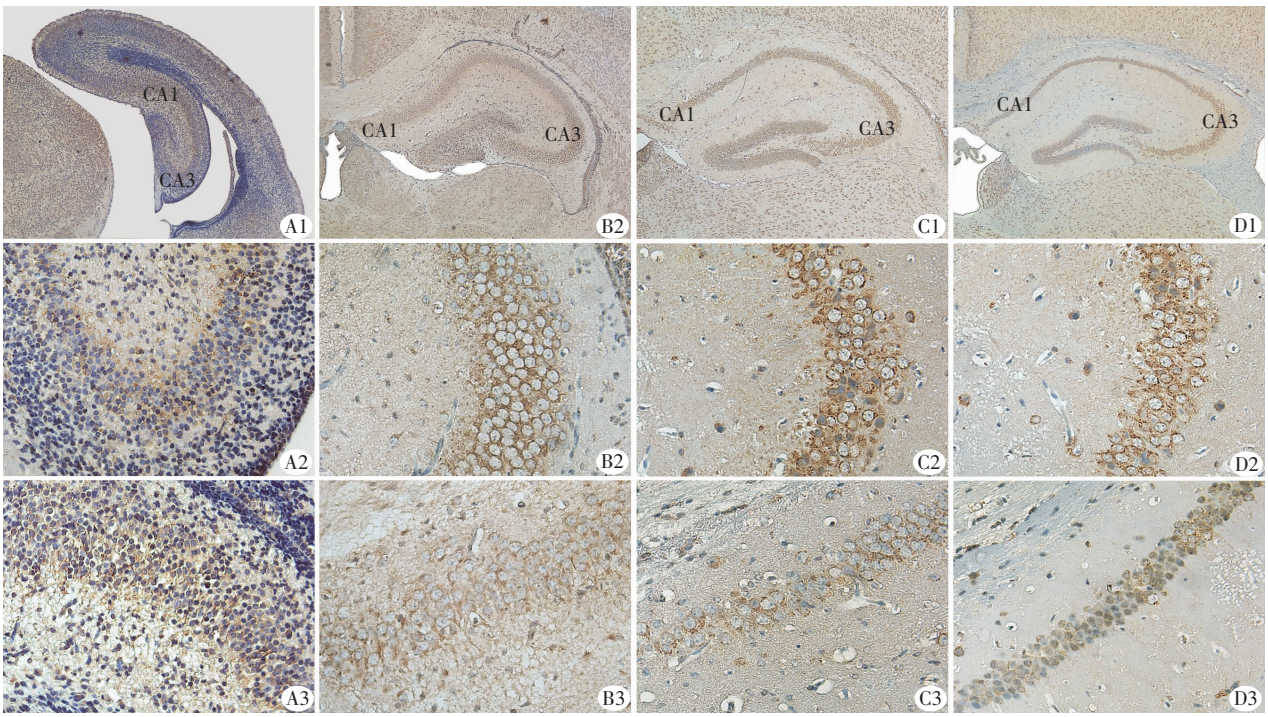
a: $P<0.01$,与前一时间点比较

图3 小鼠在胚胎期和生后不同时期Bcl-2/Bax比值变化



A:E18;B:P7;C:P21;D:18个月;A1~D1:CA区(×100);A2~D2:CA3区(×400);A3~D3:CA1区(×400)

图1 小鼠发育过程中海马Bcl-2的表达 (S-P)



A:E18;B:P7;C:P21;D:18 个月;A1 ~ D1:CA 区(×100);A2 ~ D2:CA3 区(×400);A3 ~ D3:CA1 区(×400)

图 2 小鼠发育过程中海马 Bax 的表达 (S-P)

3 讨论

脑在发育过程中存在着显著而复杂的形态学变化,在此过程中细胞凋亡起着极其重要的作用[3]。目前,人们发现细胞凋亡的作用机制非常复杂,其中 Bcl-2 凋亡调控基因家族的作用不容忽视[4-5]。Bcl-2 和 Bax 基因是这个家族中的重要成员。其表达产物,即,Bcl-2 和 Bax 蛋白在细胞内是以同源二聚体或异源二聚体的形式存在的。当 Bax 过表达时,形成同源二聚体 Bax/Bax,促进细胞凋亡;当 Bcl-2 过表达时,就形成异源二聚体 Bcl-2/Bax,促进细胞周期和细胞增殖,抑制细胞凋亡[2,4,6]。本研究发现,Bcl-2 和 Bax 蛋白在 C57/BL6 小鼠海马 CA1 ~4 区锥体层中表达存在时空特异性,P7 d 之前表达均逐渐增高,之后逐渐下降,成年后及老年期均趋于稳定,此结果与 Mooney 等[7]的研究结果相似。提示,在胚胎期和生后早期均有大量的细胞凋亡现象存在,可能是与海马在这一时期的形态学改变密切相关。

研究表明,Bcl-2/Bax 比值的变化调节细胞增殖和凋亡的平衡。Bc1-2/Bax 比值高,细胞存活率高;比值低,细胞凋亡率高[2]。White 等[8]对大鼠的研究结果表明,大鼠海马的细胞凋亡高峰在生后 1 d。本研究结果与其相符,我们发现:Bcl-2/Bax 比值在 E18 d 至 P1 d 逐渐降低,P1 d 达最低,之后趋于稳定。提示,C57/BL6 小鼠海马在胚胎期和生后早期存在着大量的细胞凋亡现象,其细胞凋亡高峰是在生后 1 d。

本研究还显示,Bcl-2/Bax 比值在成年及老年 C57/BL6 小鼠海马中维持在较低水平,这与 White 等[8]和 Mooney 等[7]对大鼠海马和大脑皮质的研究结果相符;但与 Bc1-2/Bax 比值高,细胞凋亡率低的理论相悖。推测可能是其他凋亡相关蛋白综合作用的结果。

参考文献:

[1] 张敬坤, 张莉, 郭敏. C57/BL6 小鼠海马的发育和衰老[J]. 西安交通大学学报:医学版,2010, 31(5): 544 - 547.
[2] 王彤, 刘存志, 刘玉珍, 等. bcl-2/bax 基因调控机体细胞凋亡的机制研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2008, 28(16): 1658 - 1660.
[3] Moskowitz M A, Lo E H. Neurogenesis and apoptotic cell death[J]. Stroke, 2003, 34(2): 324 - 326.
[4] Brooks C, Dong Z. Regulation of mitochondrial morphological dynamics during apoptosis by Bcl-2 family proteins: a key in Bak? [J]. Cell Cycle, 2007, 6(24): 3043 - 3047.
[5] Zeng L, Lu X, Zeng S, *et al*. Dynamic changes of apoptosis and expression of Bcl-2 family members in the posthatch hippocampus of Bengalese finches[J]. Brain Res, 2006, 1107(1): 58 - 69.
[6] Tsukahara S, Yamamoto S, Tin-Tin-Win-Shwe, *et al*. Inhalation of low-level formaldehyde increases the Bcl-2/Bax expression ratio in the hippocampus of immunologically sensitized mice[J]. Neuroimmunomodulation, 2006, 13(2): 63 - 68.
[7] Mooney S M, Miller M W. Expression of bcl-2, bax, and caspase-3 in the brain of the developing rat[J]. Brain Res Dev Brain Res, 2000, 123(2): 103 - 117.
[8] White L D, Barone S Jr. Qualitative and quantitative estimates of apoptosis from birth to senescence in the rat brain[J]. Cell Death Differ, 2001, 8(4): 345 - 356.

(**收稿**:2011-04-05;**修回**:2011-05-09)
(编辑 吴培红)