维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)02-0200-04

小鼠胚胎胃发育中细胞凋亡及凋亡相关蛋白的表达

林雪梅[1],李 均[2],汪维伟[1]

(1. 重庆医科大学基础医学院组织与胚胎学教研室,重庆 400016;2. 重庆市急救中心,重庆 400014)

【摘 要】目的:观察小鼠胚胎胃发育过程中上皮细胞凋亡及凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、P53 的表达。方法:E11d ~ E15d 胎鼠连续切片,体视学法测量胃上皮凋亡小体密度(DAB);免疫组化 SABC 法检测凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、P53 的表达。结果:①胃 DAB 峰值为 E14d ~ E15d。②Bcl-2 表达峰值为 E11 ~ 13d;Bax 表达峰值在 E14d,P53 表达峰值在 E11 ~ 13d。结论:Bcl-2 可能具有抑制胃上皮细胞凋亡的作用;Bax 可能具有促进细胞凋亡的作用;P53 可能与胃上皮细胞凋亡调控的关系不密切。

【关键词】胎鼠,胃,细胞凋亡,凋亡相关蛋白

【中国图书分类法分类号】Q954.48 【文献标识码】A 【收稿日期】2005-11-14

The apoptosis and expression of apoptosis related proteins in the developing mouse stomach

LIN Xuemei, et al

(*Department of Histology and Embryology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To observe the apoptosis and expression of apoptosis related proteins Bcl-2, Bax and P53 during the developing mouse stomach. *Methods*: Serial sections of fetal mice aged 11 ~ 15 days were made. The density of apoptotic bodies (DAB) in the epithelium was measured with stereological method. The expression of apoptosis related proteins Bcl-2, Bax and P53 in the epithelium were detected with the SABC method of immunocytochemistry, and image analysier was used to detect the products-intensity of each section. *Results*: ① The peak-expression of DAB in the epithelium was on the 14 th and 15 th day. ② The peak-expression of Bcl-2 in the epithelium was on the 11 th and 13 th day, the peak-expression of Bax in the epithelium was on the 14 th day, the peak-expression of P53 were on the 11 th and 14 th day. *Conclusion*: ① Bcl-2 may have a role in suppressing cell apoptosis in the epithelium of stomach, Bax may have a role in promoting cell apoptosis. P53 do not have close relationship with the control of epithelial cells apoptosis in fetus mouse stomach.

【Key words】Fetus mouse; Stomach; Cell apoptosis; Protein expression

从发育生物学的角度,器官的胚胎发生除了细胞增殖,还存在着细胞凋亡。胚胎消化管的发生与其上皮细胞的增殖与凋亡有关[1],但目前对于凋亡的机制尚有不同认识。近年来 Dana 等[2]发现凋亡相关蛋白 Bcl-2 蛋白家族、P53 表达于胚胎肠上皮细胞,Ladas 等[3]证实结肠腺瘤中的细胞凋亡与凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、P53 的表达关系密切。在胚胎胃的发生过程中,上皮细胞凋亡情况如何?相关蛋白是否表达?又如何对凋亡发挥调控作用?尚未见此方面的报道。为此,本研究观察了胃发育中细胞凋亡的变化,探讨凋亡相关蛋白 Bcl-2, Bax, P53 的表达时序、相互作用,旨在更深入地认识胃形态发生的调控机制,并为先天性畸形研究等提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 标本及切片制备

昆明成年未交配小鼠(25g ~ 35g),晚 10:30 以雄雌 1:3 合笼,次日清晨 7 点检查雌鼠,若见阴栓,计妊娠 0 天。分别于 E11~15d 处死孕鼠,取出胚胎,每个胎龄选中间体重 3 只。整胎多聚甲醛固定 24h,常规石蜡包埋,横断连续切片(7 ~ 8μm)。

1.2 H.E 染色及形态学、体视学观察

上述切片每 3 张取 1 张做间断连续贴片,H.E 染色。光

作者介绍:林雪梅(1969-),女,讲师,硕士,博士生,主要研究方向:胚胎发生。

基金项目:重庆市教委课题(渝教科 1999,16)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

镜观察上述发育时期胃形态变化。并对其作体视学观察，测微网格测量其上皮面积。油镜下参照 Hall 等[4]标准计数上皮内凋亡小体，计算凋亡小体密度(density of apoptotic bodies, DAB，即 DAB = 凋亡小体数 / 面积)，每个胎龄各计数 20 张切片。

1.3 免疫组化 SABC 显色法及定量分析

贴片常规脱蜡至水；入 3% H_2O_2，以灭活内源性过氧化物酶；蒸馏水洗；入 0.01mol/L 枸橼酸盐缓冲液，微波热修复抗原；PBS 洗 2 次；滴加正常山羊血清封闭，滴加 Bcl-2、Bax、P53 抗体，37℃ 1h 或 4℃过夜；PBS 洗 3 次；滴加生物素化山羊抗小鼠 IgG，PBS 洗 3 次；滴加试剂 SABC，37℃ 20min；PBS 洗 5min，4 次；滴加 DAB 溶液显色，镜下观察，有阳性产物时终止显色；苏木精复染；常规脱水，透明，中性树胶封片。(即用型 SABC 免疫组化染色试剂盒，武汉博士德公司；兔抗小鼠 Bcl-2、Bax、P53 多克隆抗体，Santacruz 公司；DAB 显色试剂盒，中山公司)。对照①阳性对照：以临组织切片做 Bcl-2、Bax、P53 蛋白表达作阳性对照；②阴性对照：以非免疫血清替代 Bcl-2、Bax、P53 抗体，设立阴性对照。图象分析系统定量分析，反应产物标记强度用平均光密度 (A) 值 ($\bar{x} \pm s$) 表示。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 统计软件及单向方差分析 LSD 法(q 检验)，取 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结 果

2.1 形态学结果

胎鼠胃上皮内凋亡小体直径 1.4μm～6.1μm，圆形，内含 1 至多个深染核碎片和强嗜酸性胞质或仅含强嗜酸性胞质，外有清楚晕环(图 1)。E11 天胃上皮内凋亡小体较少；E12 天时，凋亡小体稍多，但主要见于胃贲门部；在 E13 天，胃上皮内凋亡小体极少，小弯处偶见；在 E14、E15 天，贲门、幽门、小弯处凋亡小体均显著增多；整个观测时段大弯处凋亡小体罕见。

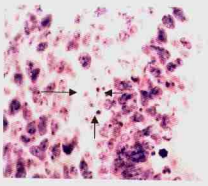


图 1 E12 天胎鼠胃贲门上皮，* 示凋亡小体 HE 染色×250

2.2 体视学结果

体视学法测得 E11～15 天胃上皮凋亡小体密度(图 2)，峰值为 E14、E15 天，与其余各天差异有统计学意义($P<0.01$)。

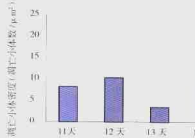


图 2 E11~15 天胃上皮凋亡小体密度

2.3 免疫组化 SABC 显色法及定量分析结果

Bcl-2、Bax、P53 在胎鼠胃上皮细胞中的表达结果见图 3。

一种凋亡相关蛋白的阳性产物均为棕黄色，见于细胞质或细胞核 (图 4～10)。胃上皮细胞中 Bcl-2 蛋白表达峰值在 E11～13 天，与其余各天差异有统计学意义($P<0.01$)，E14 天开始明显降低；Bax 蛋白表达峰值在 E14 天，除 E13 天与 E15 天、E11 天与 E12 天外，其余各天差异均有统计学意义($P<0.01$)；P53 蛋白表达峰值在 E11～13 天，与各天差异有统计学意义($P<0.01$)，E14 天明显降低。

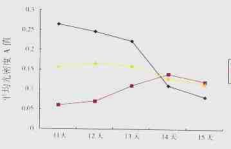


图 3 Bcl-2、Bax、P53 在胎鼠胃上皮细胞中的表达

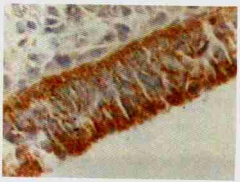


图 4 E12 天胃 Bcl-2 表达 H 复染，×400

维普资讯 http://www.cqvip.com

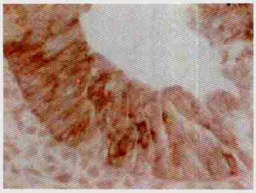


图 5 E13 天胃 Bcl-2 表达 H 复染，×400



图 6 E14 天胃 Bcl-2 表达，强度低于 E11-13d，×400

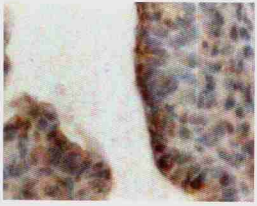


图 7 E14 天胃上皮 Bax 表达，H 复染，×400

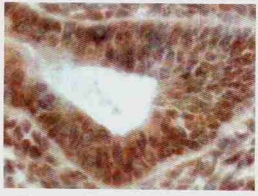


图 8 E11 天胃上皮 P53 表达，H 复染，×400

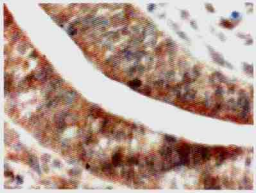


图 9 E12 天胃上皮 P53 的表达，H 复染，×400

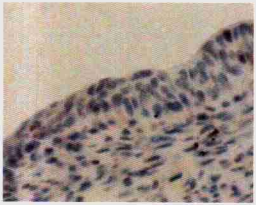


图 10 E15 天胃上皮 P53 表达弱阳性，H 复染，×400

3 讨 论

细胞凋亡既是胚胎正常发育中的重要事件，又是致畸因素导致胚胎异常发育的重要形式，因此，对细胞凋亡的研究将有助于胚胎发育机制的阐明及先天性畸形的预防。

本实验观察到 E11 天胃上皮内凋亡小体较少；E12天时，凋亡小体稍多，但主要见于胃贲门部；在E13天，胃上皮内凋亡小体极少，小弯处偶见；在E14、E15 天，贲门、幽门、小弯处凋亡小体均显著增多；整个观测时段大弯处凋亡小体罕见。通过体视学法定量测得 DAB 峰值为 E14～E15 天，与形态学结果一致。

细胞凋亡受基因程序的控制，Bcl-2 家族即是研究最多的一类调控基因。Bcl-2 家族中，Bcl-2 可抑制细胞凋亡；Bax 则可促进凋亡[5]。近年研究表明，Bax 和 Bcl-2 调节细胞凋亡，不仅取决于自身表达的高低、还与 Bax/ Bcl-2 的比率有关。当比率大时，细胞趋于凋亡[6]。同时，抑癌基因 P53 被视为调节 Bcl-2、Bax 的重要因素。

维普资讯 http://www.cqvip.com

胃上皮 Bcl-2 表达峰值在 E11～13 天，峰值时间在 DAB 峰值之前，且 E14 天 Bcl-2 表达降低时，DAB达峰值，表明 Bcl-2 可能参与了抑制胃上皮细胞凋亡。Bax 表达峰值在 E14 天，与 DAB 峰值时间一致，表明 Bax 可能起着促进胃上皮细胞凋亡的作用。本实验结果还显示：Bax/ Bcl-2 值在 E14、15 天达峰值（分别为 1.273 与 1.463，$P<0.01$），与 DAB 峰值一致。

P53 蛋白可通过激活凋亡基因 Bax 的表达，进而与 Bcl-2 形成异二聚体，抵消 Bcl-2 的抑制凋亡作用，促进细胞凋亡，与生长发育有关，但大量文献也表明并非所有细胞凋亡均须 p53 调控，Jene 等[6]即发现 P53 的转录活性在胚胎的不同组织和不同发育阶段有着不同变化。野生型 P53 蛋白在细胞内含量低，半衰期短，免疫组化法很难检测到，而突变的 P53 蛋白含量高，半衰期长，可用免疫组化法检测。本实验中，P53 高水平表达于 E11 天～13 天的胃上皮细胞，E15 天明显降低，其峰值时间与 DAB 峰值时间不一致，与 Bcl-2 峰值时间一致，但与 Bax 表达峰值时间不一致，提示 P53 可能与调控胃上皮细胞凋亡关系不密切。

器官发育是与遗传和进化紧密相关的三大生物学难题之一。现代分子生物学对发育的研究，证实了遗传控制发育的本质可归结为在发育不同时期基因的选择表达及其控制。本研究通过对凋亡关键调控阶段、凋亡相关蛋白表达的鉴定，将有助于阐明细胞凋亡的机制并为进一步揭示胃发育机理及先天性畸形的预防提供有价值的资料。

参 考 文 献

[1] Jaklevic B, Su TT. Cell turnover: flexible coupling meets the needs of development [J]. Curr Biol., 2003;13(20):805-807.

[2] Kylarova D, Vrchovecky J, Holinka M, et al. The occurrence of c-myc, P53 and bcl-2 family proteins in the early phase of development of duodenal epithelium [J]. Biomed Pap Med FacUniv Palacky Olomouc Czech Repub, 2004;148(2):229-232.

[3] Ladas SD, Kitsanta P, Triantafyllou K, et al. Cell turnover of serrated adenomas[J]. J Pathol, 2005.

[4] Hall PA, Coates RT, Ansari B, et al. Regulation of cell number in the mammalian Gastrointestinal tract: the importance of apoptosis [J]. Cell Science, 1994;107(12): 3569-3577.

[5] Helen R, Russell. Murine Ovarian Development Is Not Affected by Inactivation of the Bcl-2 Family Member Diva [J]. Molecular and Cellular Biology, 2002;22(19):6866-6870.

[6] Jene Frenkel, Saegusa M, Uegaki k, et al. Accentuated apoptosis in normally developing p53 knockout mouse embryos following genotoxic stress[J]. Oncogene, 1999;18:2901-2907.

[7] Korsmeyer SJ. Bcl-2 gene family and the regulation of programmed cell death [J]. Cancer Res, 1999;59:1693-1700.

（上接第 192 页） bcl-2表达升高，而 Bax 表达明显下降，bcl-2/Bax 的比率上升，阻止了凋亡的发生，也进一步从基因水平证明了茶多酚具有抗氧化而阻止凋亡发生的作用。Caspase-3[5]在 caspase 家族中属于凋亡效应亚类的 caspase 蛋白酶，执行剪切细胞结构蛋白的作用，直接使细胞发生凋亡，是细胞凋亡过程中最重要的终末执行酶。在 H_2O_2 造的氧化损伤细胞模型中，caspase-3 的表达是升高的，而经茶多酚处理后，其表达明显下降，这与 Wang[6]等的研究结果相一致。

本试验中，我们利用强抗氧化剂茶多酚成功阻止了 H_2O_2的氧化作用，延缓了兔晶状体上皮细胞的凋亡，并从 bcl-2、Bax、caspase-3 基因水平进行了探讨，为阻止或延缓白内障的发生提供了新的思路。

参 考 文 献

[1] Li WC, Kuszak JR, Dunn K, et al. Lens epithelial cell apoptosis appears to be a common cellular basis for non-congenital cataract development in humans and animals[J]. J cell Biol, 1995; 130(1):169-181.

[2] Herrmanm M, Lorenz HM, Voll R, et al. A rapid and simple method for the isolation of apoptotic DNA fragments [J]. Nucleic Acid Res, 1994; 22(24): 5506-5507.

[3] Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation[J]. Nature, 1980; 284:555-556.

[4] Mao YW, Xiang H, Wang J, et al. Human Bcl-2 gene alterrates the ability if rabbit lens epithelial cells against H_2O_2-induced apoptosis through down-regulation if the alpha β crytalline gene [J]. J Biol Chem, 2001;276:43435-43445.

[5] Thornberry NA, Larebnik Y. caspase enemines within[J]. Science, 1998;281:1312-1316.

[6] Wang G, Ding WP, Wang WP, et al. Expression of Bcl-2 and bax in apoptosis of nerve cell after human contusion and laceration of brain[J]. Zhongguo linchuang kanfu, 2002, 6:1137-1138.