维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2005)05－0669－04

甲基汞影响小鼠胚胎肠上皮凋亡的体外实验

张海英，汪维伟，姜　蓉

(重庆医科大学基础医学院组织与胚胎学教研室，重庆　400016)

【摘　要】目的：观察低剂量氯化甲基汞(methylmercury chloride，MMC)对胎鼠肠上皮细胞凋亡及凋亡相关蛋白表达的影响。方法：分别取 E13.5d、E14.5d 胎鼠的十二指肠及结肠，体外培养，分别加入 MMC 液(0μg/L，200μg/L，400μg/L，800μg/L)，培养 24h 后取出标本，制成石蜡切片。部分切片经 HE 染色，体视学法计数肠上皮中的凋亡小体；余切片经免疫组化染色，观察凋亡相关蛋白 Bcl－2，Bax，P53 及 c－Fos 的表达。结果：①实验各组肠上皮凋亡小体数均较对照组高，$P<0.05$，与 MMC 剂量呈正相关，$P<0.01$。②Bcl－2 在各实验组胎鼠肠上皮细胞的表达均低于对照组，$P<0.05$，与 MMC 的剂量呈负相关，$P<0.01$；而 Bax、P53 及 c－Fos 的表达则高于对照组，$P<0.05$，与 MMC 剂量均呈正相关，$P<0.01$。结论：MMC 在体外可促进胎鼠肠上皮细胞凋亡，可能是一种通过下调 Bcl－2 表达，上调 Bax 及 c－Fos 表达的机制。

【关键词】氯化甲基汞；胎鼠；肠上皮；凋亡

【中国图书分类法分类号】Q954.48　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2005－03－11

The effect of methylmercury on the epithelial apoptosis of fetal mice intestine in vitro

ZHANG Haiying, et al

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

【Abstract】*Objective*: To study the effect of methylmercury chloride (MMC) on the apoptosis and the expression of apoptosis－associated proteins in the intestinal epithelium of fetal mice. *Methods*: The duodenum and colon were taken from E13.5d and E14.5d fetal mice respectively, and cultured with different doses of MMC (0 μg/L, 200μg/L, 400μg/L, 800μg/L) for 24h. The samples were sliced into the paraffin sections. Some sections were stained with HE to count the numbers of apoptotic bodies (NAB) in the fetal intestinal epithelium with stereological method. The others were stained with the immunohistochemical method to observe the expression of apoptosis－associated proteins Bcl－2, Bax, P53 and c－Fos. *Results*: ①In experimental groups, all the NAB in the intestinal epithelium were higher than that in control groups ($P<0.05$), and there was a positive correlation between the doses of MMC and the NAB($P<0.01$). ②In all experimental groups, the expression of Bcl－2 in the intestinal epithelium was lower than that in control groups ($P<0.05$), and there was a negative correlation between the doses of MMC and the expression of Bcl－2 ($P<0.01$). However the expression of Bax, P53 and c－Fos were higher than that in control groups ($P<0.05$). There was a positive correlation between the doses of MMC and the expression of these proteins ($P<0.01$). *Conclusion*: MMC can increase the intestinal epithelium－apoptosis in fetal mice in vitro, whose mechanism may be restraining the expression of Bcl－2 and promoting the expression of Bax and c－Fos.

【Key words】Methylmercury chloride; Fetal mouse; Intestinal epithelium; Apoptosis

汞是主要的环境污染物。甲基汞可通过血脑屏障及胎盘屏障，引起胚胎神经及骨骼发育畸形或死亡，在体外可诱导胚胎多种神经细胞凋亡[1]。低剂量甲基汞可致胚胎发育迟缓及神经管未闭、小头等畸形[2]。采用体外组织培养方法，观察 MMC 对胎鼠肠上皮细胞凋亡以及凋亡相关蛋白 Bcl－2，Bax，P53 及 c－Fos 表达的影响。

1　材料与方法

1.1　实验动物

成年未交配昆明小鼠(重庆医科大学实验动物中心)，重

作者介绍：张海英(1978－　)，女，硕士生(现为军科院在读博士)，主要研究方向：胚胎消化管组织发生。

基金项目：重庆市教委课题。

维普资讯 http://www.cqvip.com

25～35g，雄雄 2∶1 于 22:00 合笼，次晨 7:30 检查发现阴栓者于该日 12:00 定为 E0.5d，随机分配到实验各组，每组 10 例。

1.2 主要试剂

MMC 纯度 95%(美国 Alfa 公司)，Bcl－2，Bax 为兔抗鼠即用型多抗，突变型 P53，c－Fos 为兔抗鼠浓缩型多抗(稀释度 1∶100)，SABC 试剂盒，DAB 试剂盒等，均购于博士德公司。表皮生长因子(epidermal growth factor，EGF)购于晶美公司。牛垂体提取物(bovine pituitary extract，BPE)，霍乱毒素、胰岛素均购于 Sigma 公司。

1.3 方法

1.3.1 培养液组成：参照文献[3]加以改进。10%标准胎牛血清，10% EGF(10ng/mL)，10% BPE(100mg/L)，10%霍乱毒素(300ng/L)，10%胰岛素(3mg/L)及 40% DMEM/F12(1∶1)。实验组各加 10%MMC 液(终浓度分别为 200ng/L、400ng/L、800ng/L)，对照组用 10%的 DMEM/F12(1∶1)取代 MMC 液。

1.3.2 组织培养：解剖显微镜下，无菌取 E13.5d、E14.5d 胎鼠的上二指肠(D 段)及结肠(C 段)，长 2～3mm，将标本置于铺有微孔滤膜(0.45μm)的不锈钢支架上，加混合培养液至支架表面水平，37℃，5% CO_2 培养 24h。

1.3.3 标本制备：培养后的标本经 4%多聚甲醛固定，常规脱水，石蜡包埋，切片厚 4～5μm。部分切片 HE 染色后体视学法计数胎鼠肠上皮中凋亡小体。余切片以免疫组化 SABC 法(方法按试剂说明进行，阴性对照以 PBS 代替第一抗体)显示凋亡相关蛋白 Bcl－2，Bax，P53，c－Fos 在肠上皮中的表达。

1.3.4 体视学分析 置测微网格于目镜中，在 HE 染色切片中观察计数各组胎鼠肠上皮的面积，高倍镜下参照 Hall 等[4]的标准计数凋亡小体数，计算出凋亡小体面积密度(density of apoptotic bodies，DAB)，即凋亡小体数/μm^2。

1.3.5 免疫组化分析 免疫组化切片经成都电子科技大学(GD－8 型图像分析系统定量分析 表达强度用面积积分光密度(area integral optical density，AIOD)，即积分光密度/μm^2 表示。

1.3.6 统计学处理 实验数据用 SPSS 10.0 统计软件的 q 检验及等级相关法进行统计分析

2 结 果

2.1 胎鼠肠上皮细胞凋亡小体计数

24h 后，可见肠上皮内有不同程度的空泡(图 1，2)。各实验组肠上皮的 DAB 值均高于对照组，$P<0.05$。除 C 段 200ng/MMC/L 组与 400ng/MMC/L 组间外，其余各组间差异均有统计学意义，$P<0.05$(表 1)。DAB 值与 MMC 的剂量呈正相关，D、C 段 r 值分别为 0.817、0.731，$P<0.01$。

表 1 实验各组肠上皮的 DAB 值($\bar{x}\pm s$)

组 别	n	E14.5d D 段	E15.5d C 段
DMEM/F12	10	2.996±0.285	2.534±0.274
200ng/MMC/L	10	4.395±0.336	3.707±0.516
400ng/MMC/L	10	5.499±0.236	4.616±0.291
800ng/MMC/L	10	6.350±0.222	5.866±0.413



图 1 D 段对照组，↑示凋亡小体，△示分裂像，▲示空泡，HE，×400

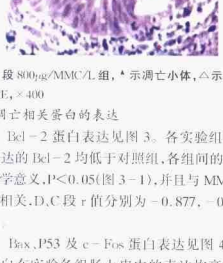


图 2 C 段 800ng/MMC/L 组，↑示凋亡小体，△示分裂像，HE，×400

2.2 凋亡相关蛋白的表达

2.2.1 Bcl－2 蛋白表达见图 3。各实验组两段肠上皮表达的 Bcl－2 均低于对照组，各组间的差异均有统计学意义，$P<0.05$(图 3－1)，并且与 MMC 剂量均呈负相关，D、C 段 r 值分别为 －0.877，－0.853，$P<0.01$。

2.2.2 Bax、P53 及 c－Fos 蛋白表达见图 4，5，6。三种蛋白在实验各组肠上皮中的表达均高于对照组，各组间三种蛋白表达的差异均有统计学意义，均为 $P<0.05$(图 7，8，9)。且三种蛋白表达的强度与 MMC 剂量均呈正相关，D、C 段 Bax 的 r 值分别为 0.889、0.865；P53 分别为 0.841、0.829；c－Fos 分别为 0.889、0.892，均为 $P<0.01$。

维普资讯 http://www.cqvip.com

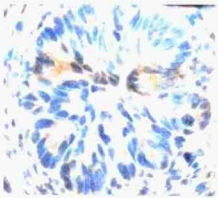


图 3 C 段 800μgMMC/L 组表达的 Bcl-2,H 复染,×400

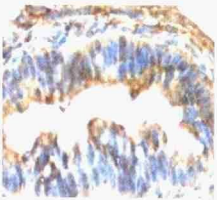


图 6 D 段 800μgMMC/L 组表达的 c-Fos,H 复染,×400

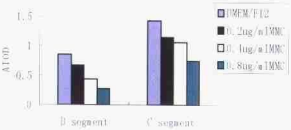


图 3-1 Bcl-2 在胎鼠 D、C 段上皮中的表达

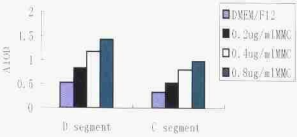


图 7 Bax 在胎鼠 D、C 段上皮中的表达

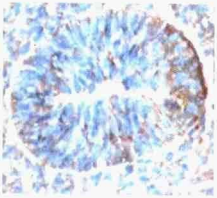


图 4 C 段 200μgMMC/L 组表达的 Bax,H 复染,×400

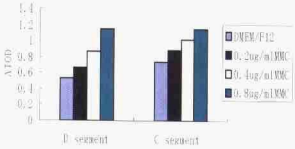


图 8 P53 在胎鼠 D、C 段上皮中的表达

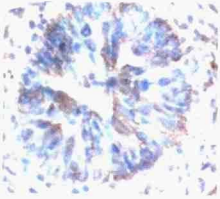


图 5 C 段 200μgMMC/L 组表达的 P53,H 复染,×400

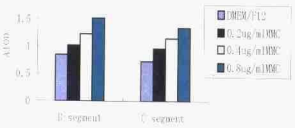


图 9 c-Fos 在胎鼠 D、C 段上皮中的表达

维普资讯 http://www.cqvip.com

3 讨 论

细胞凋亡不仅受基因调控,也受外来因素的影响[5]。甲基汞可促使胚胎神经细胞和肢芽细胞等发生凋亡,可致胚胎发育迟缓,大鼠胚胎神经管未闭、小头、短肢等畸形[2]。凋亡小体是细胞凋亡过程的形态改变之一,在 HE 染色切片中,消化管上皮内的凋亡小体易于识别,可一定程度反应细胞凋亡[4]。本文观察到:经 MMC 作用后的胎鼠肠上皮细胞凋亡增加,有明显的剂量相关性。表明 MMC 在体外也有促进胎鼠肠上皮凋亡的作用。

Bcl-2 及 Bax 同属于 Bcl-2 蛋白家族的成员,前者有抗凋亡作用,后者则有促凋亡的作用。Bax 和 Bcl-2 的表达比率是决定细胞是否凋亡的重要调控因素,Bcl-2 过度表达,与 Bax 形成异源二聚体,抑制细胞凋亡;若 Bax 过度表达,Bax 形成同源二聚体,促进细胞凋亡。本实验中,胎鼠肠上皮在体外经 MMC 作用后,Bax 表达增加,Bcl-2 表达降低,提示下调 Bcl-2 表达,上调 Bax 表达可能是 MMC 促进胎鼠肠上皮细胞凋亡的机制之一。

p53 是典型的抑癌基因,野生型 p53 有促进细胞凋亡的作用,突变型 p53 则能促进细胞增殖,抑制细胞凋亡[6]。Schmid[7] 等的实验表明 p53 参与胚胎消化管上皮细胞增殖的调控。许传杰等[8] 在 MMC 促大鼠神经细胞凋亡的实验中,免疫组化显示 P53 蛋白表达增强,认为 P53 可能参与了 MMC 介导的神经细胞凋亡调控。本研究中随着 MMC 剂量的加大,肠上皮表达的突变型 P53 增强,呈明显剂量相关性,与许传杰等的结果一致。但突变型 P53 应为抑制细胞凋亡,在 MMC 促进胎鼠肠上皮细胞凋亡中有何作用,尚待进一步研究。

c-fos 属原癌基因,是细胞生长与增殖的重要调控因子。MMC 在促胚胎神经细胞凋亡中有 c-fos 的过度表达[9,10],表明 c-fos 参与 MMC 的胚胎神经毒性作用,可能是 c-fos 的异常表达干扰了细胞核修复功能或细胞的正常调节信号,触发了细胞凋亡[11]。本文 MMC 促胎鼠肠上皮凋亡伴有 c-Fos 表达的增强,提示 c-Fos 可能参与 MMC 促胚胎肠上皮细胞凋亡的调控。c-fos 的产物具有跨核膜传递信息之功能,故被称为第三信使。c-Fos 是否影响 Bcl-2、Bax 及 P53 的表达,从而参与 MMC 促肠上皮细胞凋亡的调控,尚需进一步研究。

参 考 文 献

[1] 程金平,王文华,贾金平,等.氯化甲基汞对大鼠脑 c-fos 和 c-jun 基因表达的影响[J].环境科学,2003;24(1):52-56.

[2] 李 勇,李 松,赵如冰,等.甲基汞对大鼠胚胎细胞毒性和相关基因表达的影响[J].中华预防医学杂志,1999;33(2):81-84.

[3] Tsukada S, Ichinose M, Yahagi N, et al. Induction of precious pepsinogen synthesis by glucocorticoids in fetal rat gastric epithelium in organ culture: Importance of mesenchyme for epithelial differentiation [J]. Differentiation, 1998; 62: 239-247.

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

[5] Javadi P, Buchman TG, Stromberg PE, et al. High-dose exogenous iron following cecal ligation and puncture increases mortality rate in mice and is associated with an increase in gut epithelial and splenic apoptosis[J]. Crit Care Med, 2004; 32(5): 1178-1185.

[6] Vousden KH. p53: death star[J]. Cell, 2000; 103(5): 691-694.

[7] Schmid P, Lorena A, Hameister H, et al. Expression of p53 during mouse embryogenesis[J]. Development, 1991; 113: 857-865.

[8] 许传杰,李志超,毕晓颖,等.氯化甲基汞对大鼠神经细胞凋亡基因 p53 表达的影响[J].中国公共卫生杂志,1999;15(4):285-290.

[9] Bulleit RF, Cui H. Methylmercury antagonizes thesurvival-promoting activity of insulin-like growth factor on developing cerebellar granule neurons[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1998; 153: 161-168.

[10] 郭 丽,毕晓颖,张兴国,等.氯化甲基汞对大鼠脑神经细胞 c-fos 表达的影响[J].中华预防医学杂志,2001;35(5):309-311.

[11] Hu L, Hatano M, Ruther U, et al. Overexpression of c-fos induces apoptosis of $CD4^+$ pro-B cells[J]. J Immunol, 1996; 157(9): 3804-3811.