维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2004)01－0024－03

阿霉素诱导兔眼后囊晶状体上皮细胞凋亡及其凋亡基因的表达

李　立，汤永强

(重庆医科大学第二临床学院眼科，重庆　400010)

【摘　要】目的：探讨阿霉素对兔晶状体摘除术后诱导后囊晶状体上皮细胞凋亡并观察凋亡相关基因(P53、Bcl－2)的表达。方法：在 12 只兔眼晶状体囊外摘除术中分别注入 0.2ml 阿霉素(0.4mg/L)，在术后 3 周、8 周分别行 TUNEL 法和免疫组化 SABC 法染色，计算 P53、Bcl－2 基因表达阳性百分率。结果：术后 3、8 周 TUNEL 法标记的阳性凋亡细胞比对照组明显增多($P<0.05$)。P53 蛋白表达阳性率在 3、8 周比对照组显著增多($P<0.01$)。Bcl－2 蛋白表达阳性率在 3 周时显著减少($P<0.01$)，在 8 周时仍比对照组减少($P<0.05$)。结论：阿霉素诱导兔后囊晶状体上皮细胞凋亡，用药组 P53 基因表达而 Bcl－2 基因低表达，提示 P53、Bcl－2 基因可能参与晶状体上皮细胞凋亡的调控。

【关键词】晶状体上皮细胞；凋亡；蛋白表达；P53；Bcl－2

【中国图书分类法分类号】Q255；R979.1　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2003－05－20

Apoptosis of posterior capsular lens epithelial cell induced by adriamycin and the expression of apoptosis－related gene in rabbit

LI Li, et al

(*Department of Ophthalmology, the Second College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the effect of adriamycin(ADR) as therapeutic agent inducing rabbit posterior capsular lens epithelial cell apoptosis and to assess the relationships between P53, Bcl－2 after lens extracapsular extraction. *Methods*: Twelve rabbit eyes were injected with 0.2mg ADR($0.4mg \cdot L^{-1}$) during lens extracapsular extraction performed respectively in the third week and the eighth week after the operation. With TdT－mediated dUTP nick end labeling(TUNEL) and immunohistochemical(SABC) staining. The protein expression cell rate of P53 and Bcl－2 were detected. *Results*: Positive pericyte muclei labeled by TUNEL increased more significantly than those in the control guoup from the third week to the eighth week after the operation. P53 protein expression was significantly higher($P<0.01$) and Bcl－2 protein expression was significantly lower($P<0.05$) than those in the control group in the third week and the eighth week after the opreration. *Conclusion*: ADR－induced rabit posterior capsular lens epithelial cell apoptosis, P53 protein expression is higher and Bcl－2 protein espression is lower in ADR group eyes. P53 and Bcl－2 may play an important role in modulatong the lens epithelial cell apoptosis.

【Key words】Adrimagcine; Lens epithelial cell; Apoptosis; Protein expression; P53; Bcl－2

白内障术后残留的晶状体上皮细胞增生、移行和分泌胶原蛋白，可致晶状体后囊膜混浊，从而影响白内障手术的复明效果，虽然国内外学者对此进行了多年的研究，尚无突破性进展。目前对后囊晶状体上皮细胞凋亡的分子调控机制认识甚少，本研究应用阿霉素于兔晶状本囊外摘除术中，在已观察其凋亡的组织病理变化的基础上[1]，探讨其分子调控机制，从而在基因水平上对防治后发性白内障的发生机制提供实验基础。

作者介绍：李　立(1963－　)，男，硕士，副教授，主要研究方向：后发性白内障的防治。

1　材料和方法

1.1　动物模型的制备

12 只健康新西兰白色家兔(重庆医科大学实验动物中心提供)，体重 1～2kg，雌雄兼顾，眼部检查无异常。每只兔右眼为用药眼，分为 3 周、8 周两组，兔晶状体囊外摘除术为同一术者操作(方法略)。手术缝合切口后于囊袋内注入 0.2ml 阿霉素(0.4mg/L)。术后动物饲养于该中心饲养房。

1.2　主要药品试剂

阿霉素(adriamycin)(意大利 Farmitalia Carld Erba 公司)

TUNEL 药盒(德国 Boehringer Mannheim 公司)

维普资讯 http://www.cqvip.com

Bcl－2、P53 免疫组化染色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。

1.3 后囊膜石蜡切片的制备

各组兔到期后，空气栓塞处死，取后囊膜，在 100mg/L 福尔马林固定液中固定 24h，经逐级酒精脱水，常规石蜡包埋、切片。

1.4 后囊膜 TUNEL 法染色

TUNEL 药盒，按试剂盒说明书染色，显微镜下观察和照相。采用 CM－2000B 生物医学图象分析系统对凋亡细胞进行计数，以凋亡指数(apoptosis index，AI)，即 10 个高倍视野下 200 个后囊晶状体上皮细胞中 TUNEL 阳性细胞百分比，反映细胞凋亡程度。计算公式：AI＝(TUNEL 阳性细胞数/200)×100%。

1.5 后囊膜切片免疫组化染色

石蜡切片脱蜡、水化，3% H_2O_2 室温下存放 10min，灭活内源性过氧化物酶，微波炉处理标本 10min(92～98℃)，行抗体修复；滴加 1∶50 正常血清封闭液，室温 10min；分别滴加适当稀释的小鼠抗 Bcl－2 和抗 P53 基因抗体，4℃ 过夜，PBS 洗 25min 共 3 次；滴加 SABC 试剂，20～37℃ 20min，PBS(0.01M)洗 5min 共 4 次，水洗 1 次，取 1ml 蒸馏水，加试剂盒中 A、B、C 试剂合 1 滴，混匀后加至切片，室温显色，镜下控制反应时间，蒸馏水洗涤，轻度复染、水洗，干燥后水溶性封片剂封片，显微镜观察照相。

结果判定：

P53 阳性细胞为胞浆呈棕黄色，Bcl－2 阳性细胞为胞膜、胞浆棕黄色，随即选取 5 个视野，计算 50 个细胞，计数阳性细胞数，计算 P53、Bcl－2 阳性率。

1.6 统计学方法

本研究数据采用 χ^2 检验进行统计学处理。

2 结 果

表 1 对照组与用药组后囊膜 200 个晶状体上皮细胞凋亡程度，AI(%)

组别	3 周	8 周
对照组	6.17	4.31
用药组	18.63**	8.32*

*：$P<0.05$ **：$P<0.01$ 与对照组比较

表 2 对照组与用药组后囊膜 P53、Bcl－2 表达阳性细胞百分率(%)

	组别	3 周	8 周
P53	对照组	18.60±5.17	12.80±3.25
	用药组	36.70±8.23**	21.30±5.68**
Bcl－2	对照组	6.0±2.13	3.20±0.32
	用药组	3.0±0.04*	2.40±2.01*

*：$P<0.05$ **：$P<0.01$ 与对照组比较



图 1 P53 在正常兔晶状体上皮细胞中的无蛋白表达 SABC ×200



图 2 Bcl－2 在正常兔晶状体上皮细胞中的无蛋白表达 SABC×200



图 3 术后 3 周兔后囊对照组 TUNEL 染色×200

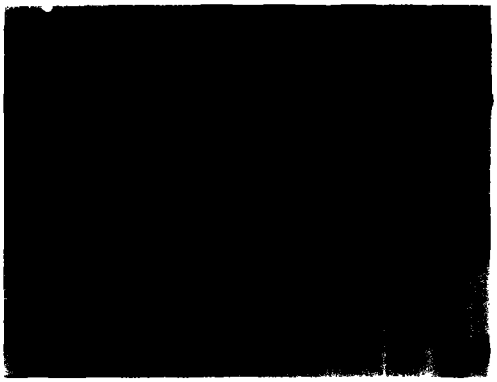


图 4 术后 3 周兔后囊用药组 TUNEL 染色×200

维普资讯 http://www.cqvip.com



图 5 术后 3 周对照组 P53 在兔后囊晶状体上皮细胞中的蛋白表达 SABC×400



图 6 术后 3 周用药组 P53 在兔后囊晶状体上皮细胞中的蛋白表达 SABC×400



图 7 术后 3 周对照组 Bcl－2 在兔后囊晶状体上皮细胞中的蛋白表达 SABC×400



图 8 术后 3 周用药组 Bcl－2 在兔后囊晶状体上皮细胞中的蛋白表达 SABC×400

2.1 后囊膜晶状体上皮细胞凋亡

表 1 所示，3 周、8 周实验组凋亡阳性细胞比对照组明显增多(图 1、2)，有显著性差异($P<0.05$)。

2.2 后囊膜晶状体上皮细胞 P53、Bcl－2 蛋白表达

表 2 所示，P53 蛋白免疫组化染色显示，用药组 3 周、8 周细胞出现强的阳性染色，阳性率比对照组明显增多(图 3、4)($P<0.01$)，8 周时逐渐减少。Bcl－2 在 3 周时阳性率低(图 5、6)，比对照组明显低($P<0.01$)，在 8 周时仍然较低，与对照组有显著性差异($P<0.05$)。

3 讨 论

3.1 晶状体上皮细胞凋亡的特点与意义

白内障术后晶状体后囊混浊是白内障术后的最主要并发症。应用阿霉素诱导其残留晶状体上皮细胞凋亡，减少其发生。本研究应用 TdT 介导的 duTP 缺口末端标记法(TUNEL 法)，证实晶状体摘除术后应用阿霉素，后囊晶状体上皮细胞出现大量凋亡现象，抑制晶状体上皮细胞的增殖。以前的研究结果[1,2]也证实，抑制机理是通过诱发细胞“自杀”程序所致。

3.2 P53 和 Bcl－2 在后囊晶状体上皮细胞的表达

P53 基因位于人类 17 号染色体短臂上(17P[13,1])具有转录因子的活性，P53 基因的主要生物学功能是引起细胞周期阻滞，诱导细胞凋亡和分化，P53 分为两种类型：野生型和突变型。正常野生型 P53 蛋白具有细胞生长抑制作用，其功能是通过诱导抑制细胞增殖作用的基因转录实现[3]。特别是细胞 DNA 受损断裂后，影响细胞周期调控点，使细胞停滞在 G1 期或 G2 期[4]。通常情况下，正常组织中野生型 P53 蛋白表达水平很低，当细胞 DNA 损伤后，P53 基因激活，P53 蛋白增多，以终止细胞增殖，使损伤 DNA 得以修复，保持细胞基因组的完整性。如果修复失败，P53 蛋白持续升高，便可诱导细胞凋亡。当 P53 基因发生突变时，突变的 P53 蛋白不能引起细胞增殖的停滞或凋亡，导致细胞生长失控，肿瘤发生[5]。本研究发现术后 3 周、8 周时用药组后囊晶状体上皮细胞 P53 蛋白高表达，表明了 P53 蛋白参与了晶状体上皮细胞凋亡的调控，促进细胞凋亡。

抗凋亡基因 Bcl－2 定位于人类染色体 18q21，它是通过染色体内的转位活化导致其(下转第 30 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

们也观察到 CVVH/CAVH 组心功能的改善情况明显好于 IHD 组，两组间的差异有统计学意义。另外，CVVH/CAVH 还能使血管紧张、去甲肾上腺素和醛固酮水平上升，纠正低钠血症、消除肺水肿或全身水肿、恢复对利尿剂的反应[6]。

目前 CVVH/CAVH 不仅用于 CRF 并发 CHF 的治疗中，也越来越广泛地用于心脏手术后[7]、难治性的充血性心力衰竭[8]、MODS[9]等的治疗。但 CVVH/CAVH 能否明显地降低维持性血透患者的心血管疾病的发生率和死亡率，还需长期随访。

参 考 文 献

[1] 沈清瑞，叶任高，主编. 血液净化与肾移植[M]. 第 1 版，北京：人民卫生出版社，1999；87.

[2] Ronco C, Bellomo R. Continuous renal replacment therapy: Evolution techology and current nomenclature[J]. Kidney Int, 1998; 53(suppl 66): 160.

[3] 季大玺，谢红浪，黎磊石，等. 连续性血液滤过治疗在重症急性肾功能衰竭治疗中的应用[J]. 中华内科杂志，1999；38：802－805.

[4] 季大玺，谢红浪. 连续性血液滤过治疗临床试验应用的进展[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志，1999；3：266－272.

[5] Tetta C, Mariano F, Ronce C, et al. Relevance of plateleting in inflammation and sepsis: mechnisms and kidney removal in extracorporeal treatment[J]. Am J Kidney Dis, 1997; 30 (Supple)4: 57.

[6] Lauer A, Alvis R, Avram M. Hemodynamic consequences of continuous arteriovenous hemofiltration[J]. Am J Kidney Dis, 1998; 12: 110.

[7] Ouseph R, Brier ME, Jacobs AA, et al. Continuous veriovenous hemofiltration and hemodialysis after orthotopic heart transplantation[J]. Am J Kidney Dis, 1998; 32(2): 290－294.

[8] Brause M, Deppe CE, Hollenbeck M, et al. Congestive heart failure as an indication for continuous renal replacement therapy[J]. Kidney Int Suppl, 1999; 72: S95－S98.

[9] Bellomo B, Farmer M, Bhonagir O, et al. Changing acute renal failure treament from intermittent hemodialysis to continuous hemofiltration: impact on azotemic control[J]. Int J Artif 0 rgans, 1999; 22: 145－150.

(上接第 26 页)

编码的蛋白产物过度表达。体外实验提示 Bcl－2 抑制凋亡的发生[6]。Bcl－2 蛋白在核膜、内质网、线粒体膜上呈斑片状分布，在成人组织内 Bcl－2 蛋白的阳性表达仅限于部分能够连续不断“自杀更新”组织内的少数不成熟细胞，如皮肤的基底细胞、骨髓的造血细胞等[7]。细胞凋亡是由于细胞中活性氧类物质所积累引起的，一些抗氧化剂能阻断生长因子缺失引起的凋亡，而 Bcl－2 是一种过氧化物，能抑制过氧化物诱导的凋亡[8]。本研究发现，用阿霉素 3 周、8 周，Bcl－2 基因低表达，表明阿霉素抑制了 Bcl－2 的表达而促进晶状体上皮的凋亡。

综上所述，阿霉素抑制兔后囊晶状体上皮细胞增殖的机理是通过促进 P53 蛋白的高表达和抑制 Bcl－2 蛋白表达使其细胞发生凋亡而实现的。P53 和 Bcl－2 两种基因在后囊晶状体上皮细胞凋亡调控中起着重要作用。

参 考 文 献

[1] 李 立，汤永强. 阿霉素防治兔后囊混浊的实验与临床研究[J]. 眼科新进展，2001；21：326－328.

[2] 李 立，李绍珍. 阿霉素对兔晶状体上皮细胞凋亡的诱导[J]. 中华眼科杂志，1998；34：461－462.

[3] Kastan MB, Onyelswere O, Sidransky D, et al. Participation of P53 protein in the cellular response to DNA damage[J]. Cancer Res, 1991; 51: 6304－6311.

[4] Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, et al. P53 tumor supperssor gene[J]. Nature, 1991; 531; 453－456.

[5] Mekrantz W, Schlegel R. Apoptosis and cell cycle[J]. J Cell Biochem, 1995; 58(2): 160.

[6] Cory S. Regulation of lymphocyte survival by the Bcl－2 gene family[J]. Am Rev Immunol, 1995; 13: 513－543.

[7] Hockenberg DM, Zutter M, Hickty W, et al. Bcl－2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991; 88: 6961－6965.

[8] 李元彬，陈 薇，朱凤云，等. P53 和 Bcl－2 在老年性白内障晶状体上皮细胞中蛋白表达的研究[J]. 中国实用眼科杂志，2003；21：180－183.