维普资讯 http://www.cqvip.co

文章编号:0253－3626(2005)01－0067－04

氢化可的松对小鼠胚胎肠上皮凋亡的影响

张海英，林雪梅，汪维伟

(重庆医科大学基础医学院组胚教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察氢化可的松(hydrocortisone,HC)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段,体外组织培养,实验各组分别加入 HC 液(0μg/ml,0.5μg/ml,1.0μg/ml,2.0μg/ml),培养 24h 后取出标本,制成石蜡切片。部分切片经 HE 染色,体视学法观测胎鼠肠上皮中的凋亡小体数;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各实验组胎鼠肠上皮凋亡小体数均较对照组高,$P<0.05$,与 HC 剂量呈正相关,$P<0.01$。②各实验组胎鼠肠上皮细胞表达的 Bcl－2 均较对照组低,$P<0.05$,与 HC 的剂量呈负相关,$P<0.01$;而 Bax 及 c－Fos 的表达则高于对照组,$P<0.05$,与 HC 剂量均呈正相关,$P<0.01$;P53 的表达差异无统计学意义。结论:HC 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 P53 非依赖机制。

【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】2004－09－09

The effect of hydrocortisone on epithelial apoptosis in fetal mice intestine

ZHANG Haiying, et al

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

【Abstract】*Objective*: To study the effect of hydrocortisone (HC) on apoptosis and expression of apoptosis－associated proteins in the intestinal epithelium of fetal mice. *Methods*: The duodena and colons were taken from E13.5d and E14.5d fetal mice respectively, and cultured with different doses of HC (0 μg/ml, 0.5μg/ml, 1.0μg/ml, 2.0μg/ml). After 24h, the samples were sliced up 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. Others were stained with the immunohistochemical method to observe the expression of Bcl－2, Bax, P53 and c－Fos. *Results*: ①In each experimental group, the NAB were higher than that of control group ($P<0.05$), and there was a positive correlation between the doses of HC and the NAB ($P<0.01$). ②In all experimental group, the expression of Bcl－2 in the intestinal epithelium of fetus was lower than that of control group ($P<0.05$), and there was a negative correlation between the doses of HC and the expression of Bcl－2 ($P<0.01$). But the expression of Bax and c－Fos in experimental group was higher than that of control group ($P<0.05$), and there was a positive correlation between the doses of HC and the expression of these proteins ($P<0.01$). The significant change in expression of P53 was not observed. *Conclusion*: HC can increase the intestinal epithelium－apoptosis of fetal mice in vitro. The effect may be a P53－independent mechanism completeed through restraining the expression of Bcl－2 and promoting the expression of Bax and c－Fos.

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

糖皮质激素(glucocorticoid,GC)是临床上常用的激素,可引起新生儿血糖升高、肝坏死、骨髓炎、T 淋巴细胞免疫抑制、发育抑制等。动物实验证明,GC 可抑制胎仔生长,致腭裂等畸形[1]。GC 还可诱导 L 细胞、嗜酸性粒细胞、成骨细胞、甲状腺细胞等发生凋亡[2,3]。GC 对胚胎肠上皮细胞凋亡的影响尚未见报道。本研究旨在观察 HC 在体外对胎鼠肠上皮细胞凋亡及凋亡相关蛋白 Bcl－2,Bax,P53,c－Fos 表达的影响,以研究 HC 胚胎毒性的机制。

作者介绍:张海英(1978－),女,硕士生,博士生,主要研究方向:胚胎发生。

1 材料与方法

1.1 实验动物

成年未交配昆明种小鼠(重庆医科大学实验动物中心,普通级),25～35g 重。以雌雄 2:1 于 22:00 点合笼交配,次

维普资讯 http://www.cqvip.com

晨 7:30 检查阴栓,发现阴栓者于该日 12:00 点定为 E0.5d,随机分配到各实验组和对照组,每组 10 例。

1.2 主要试剂

HC 干粉购于 Sigma 公司。Bcl-2、Bax 抗体(兔 IgG 多抗,即用型),P53、c-Fos 抗体(兔 IgG 多抗,浓缩型,稀释度为 1:100),SABC 即用型试剂盒,DAB 底物显色试剂盒等,均购于博士德公司。

1.3 方法

1.3.1 培养液组成 参照文献[4]加以改进。10%标准胎牛血清,10%EGF(10ng/ml),10%BPE(100μg/ml),10%霍乱毒素(0.3μg/ml),10%胰岛素(3μg/ml)及 40%DMEM/F12(1:1)。实验组各加 10%HC 液(终浓度分别为 0.5μg/ml、1.0μg/ml、2.0μg/ml),对照组加 10%的 DMEM/F12(1:1)。

1.3.2 组织培养 解剖显微镜下,无菌取 E13.5d、E14.5d 胎鼠的十二指肠近幽门段(D 段)及结肠近端段(C 段),长 2mm~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 孵箱中培养 24h。

1.3.3 标本制备 培养后的标本以 4%多聚甲醛固定,常规脱水,透明,石蜡包埋,连续切片(厚 4μm~5μm)。部分切片经 HE 染色后,体视学法观测胎鼠消化管上皮中的凋亡小体数;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 Bcl-2、Bax、P53、c-Fos 在肠上皮细胞中的表达。

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肠上皮的面积,高倍镜下计数上皮内的凋亡小体数[5],算出凋亡小体密度(density of apoptotic bodies, DAB),即凋亡小体数/μm^2。

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

1.3.6 统计学处理 实验所得数据用 SPSS10.0 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

D、C 段体外培养 24h 后,可见肠上皮内出现不同程度的空泡改变(图 1)。HC 实验各组肠上皮的 DAB 值均较对照组高,$P<0.01$(表 1)。各段实验各组间的差异均有统计学意义,$P<0.05$。D、C 段上皮的 DAB 值与 HC 剂量呈正相关,r 值分别为 0.853、0.822,$P<0.01$。

2.2 凋亡相关蛋白的表达



图 1 0.5μg/ml HC 组 D 段,↑示凋亡小体,HE,×200

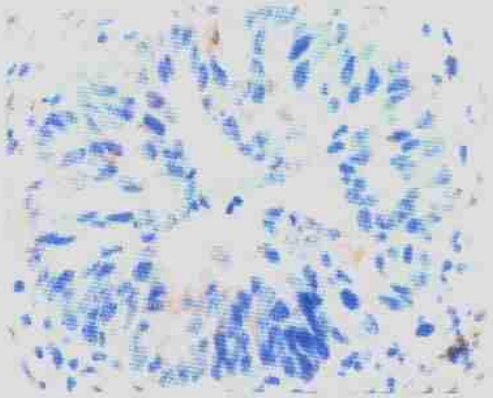


图 2 C 段 2.0μg/ml HC 组表达的 Bcl-2,H 复染,×400

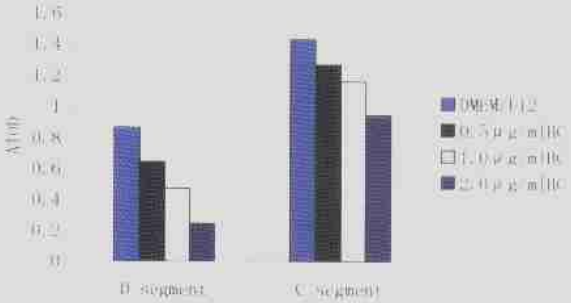


图 3 Bcl-2 在胎鼠 D、C 段上皮中的表达



图 4 C 段 2.0μg/ml HC 组表达的 Bax H 复染,×400

2.2.1 Bcl-2 蛋白表达见图 2。实验各组 Bcl-2 的表达值均低于对照组,$P<0.01$(图 3),实验组间的差异均有统计学意义,$P<0.05$。Bcl-2 的 AIOD

维普资讯 http://www.cqvip.com

值与 HC 剂量呈负相关，D、C 段的 r 值分别为 −0.877，−0.865，$P<0.01$。

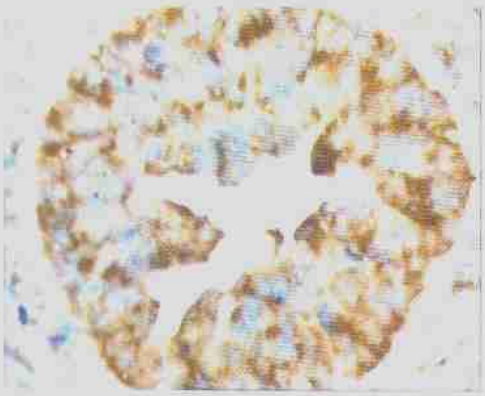


图 5　D 段 2.0μg/ml HC 组表达的 c－Fos，H 复染，×400

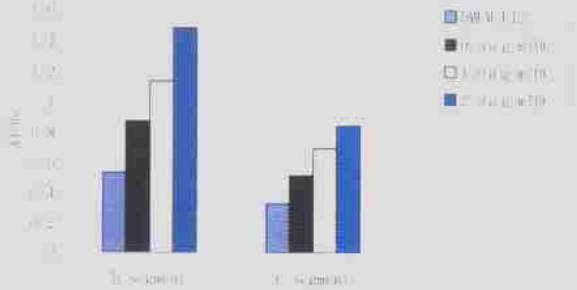


图 6　Bax 在胎鼠 D、C 段上皮中的表达

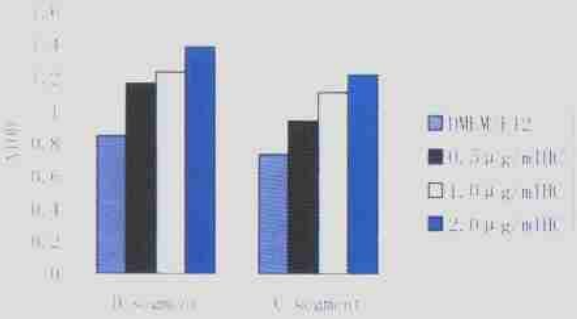


图 7　c－Fos 在胎鼠 D、C 段上皮中的表达

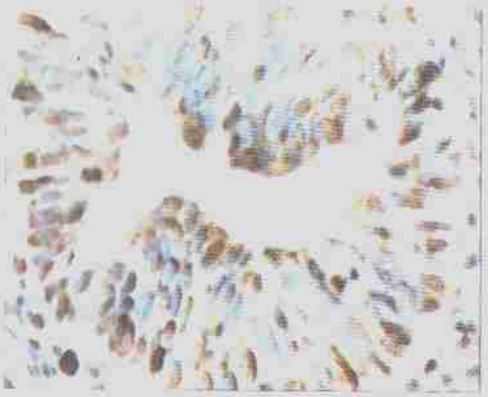


图 8　D 段 2.0μg/ml HC 组表达的 P53，H 复染，×400

2.2.2　Bax、c－Fos 蛋白表达见图 4，5。两种蛋白的表达均高于对照组（图 6，7），统计结果均为 $P<0.05$。除了 c－Fos 在 D 段 0.5μg/mlHC 组与 1.0ug/mlHC 组之间外，其余各实验组间的差异均有统计学意义，$P<0.05$。两种蛋白的 AIOD 值与 HC 剂量均呈正相关，D、C 段 Bax 的 r 值分别为 0.889，0.891；c－Fos 的 r 值分别为 0.782，0.817，均为 $P<0.01$。

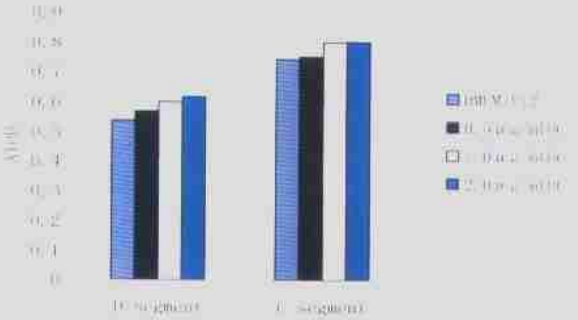


图 9　P53 在胎鼠 D、C 段上皮中的表达

表 1　实验各组肠上皮的 DAB 值（$\bar{x}\pm s\times10^{-4}$）

组别	n	E14.5d D 段	E15.5d C 段
DMEM/F12	10	2.996±0.285	2.534±0.374
0.5μg/mlHC	10	4.032±0.196	4.042±0.224
1.0μg/mlHC	10	5.174±0.185	5.073±0.320
2.0μg/mlHC	10	6.210±0.264	6.177−0.278

2.2.3　P53 蛋白表达见图 8。P53 的表达在实验各组之间以及与对照组之间的差异均无统计学意义，$P>0.05$（图 9）。P53 的 AIOD 值与 HC 剂量间无相关性，r 值分别为 0.320，0.291，$P>0.05$。

3　讨　论

细胞凋亡是胚胎发生的基础，不仅受遗传调控，也受多种环境因素的影响[6]。GC 不仅能维持成体胃上皮细胞的正常功能及数量，还可促进胚胎胃上皮细胞分化，抑制其增殖[4]。Gama 等[7]报道 GC 有抑制幼鼠胃上皮细胞增殖并促进其凋亡的作用。本实验观察到：HC 作用于胎鼠肠管 24h 后，其上皮中凋亡小体数明显增加，呈明显的剂量相关性。提示 HC 在体外有促进胎鼠肠上皮细胞凋亡的作用。

GC 促细胞凋亡涉及一些重要的凋亡相关因子，如 Bcl－2、P53、转录活化因子 AP－1 等，但不同细胞，这些因子的作用不一。外源性 bcl－2 基因的高表达可延迟但不阻止 GC 诱导儿童淋巴细胞瘤细胞系 CCRF－CEM 细胞凋亡的发生[8]。Bcl－2 的高表达却可阻止 GC 诱导淋巴细胞凋亡的发生[9]。GC 还可通过抑制 Bcl－2 的表达，促进 Bax 的表达

维普资讯 http://www.cqvip.com

来诱导新生大鼠海马神经元凋亡[10]。本文 HC 作用于胎鼠肠管 24h 后，Bcl－2 的表达低于对照组，而 Bax 的表达则增高，呈明显的剂量－反应相关性，提示 HC 促胎鼠肠上皮细胞凋亡的作用，可能是通过抑制 Bcl－2 的表达，促进 Bax 的表达来实现的。

缺乏 p53 基因的小鼠胸腺细胞可保留对 GC 诱导凋亡的反应，表明 P53 不参与此反应[8]。本实验发现 P53 在各实验组的表达差异没有统计学意义，提示 HC 诱导胎鼠肠上皮细胞凋亡与 P53 关系不密切，可能是一种 P53 非依赖性方式。

AP－1 是由 c－Jun 和 c－Fos 两种蛋白组成的异二聚体，在细胞凋亡中起重要作用。GR 与 AP－1 相互作用后，可作用于 AP－1 结合位点来调节某基因的表达[11]。本文各实验组 c－Fos 的表达量均高于对照组，且与 HC 剂量呈明显正相关。提示 HC 促胎鼠肠上皮细胞凋亡中可能有 c－Fos 的参与。

参 考 文 献

[1] Shimizu N, Aoyama H, Hatakenaka N, et al. An in vitro screening system for characterizing the cleft palate－inducing potential of chemicals and underlying mechanisms[J]. Reprod Toxicol, 2001; 15(6): 665－672.

[2] Meagher LC, Cousin JM, Seckl JR, et al. Opposing effects of glucocorticoids on the rate of apoptosis in neutrophilic and eosinophilic granulocytes[J]. J Immunol, 1996; 156: 4422－4428.

[3] Silvestrini G, Ballanti P, Patacchioli FR, et al. Evaluation of apoptosis and the glucocorticoid receptor in the cartilage growth plate and metaphyseal bone cells of rats after high－dose treatment with corticosterone[J]. Bone, 2000; 26: 33－42.

[4] 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.

[5] 汪维伟，曾小川. 小鼠胚胎食管和肠上皮的体视学研究[J]. 解剖学报，2000; 31(1): 73－76.

[6] 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.

[7] Gama P, Goldfeder EM, de Moraes JC, et al. Cell proliferation and death in the gastric epithelium of developing rats after glucocorticoid treatment[J]. Anat Rec, 2000; 260(3): 213－221.

[8] Kofler R. The molecular basis of glucocorticoid－induced apoptosis of lymphoblastic leukemia cells[J]. Histochem Cell Biol, 2000; 114(1): 1－7.

[9] Hockenbery D, Nunez G, M;ii;man C, et al. Bcl－2 is an inner mitochondrial membrane protein that block programmed cell death[J]. Nature, 1990; 348: 334－336.

[10] 张建宁，孙红宇，杨树源，等. 糖皮质激素对大鼠海马神经元影响的体外研究[J]. Chin J Nerv Ment Dis, 2003; 29(3): 196－198.

[11] Zhou F, Thompson EB. Role of c－jun induction in the glicocorticoid－eviked apoptotic pathway in human leukemic lymphoblasts[J]. Mol Endocrinol, 1996; 10(3): 306－316.

(上接第 62 页)

参 考 文 献

[1] Buckley PF, The Role of Typical and Atypical Antipsychotic Medications in the Management of Agitation and Aggression[J]. J Clin Psychiatry, 1999; 60(supp 110): 52－60.

[2] Patsalos PN, The Mechanism of Action of Topiramate[J]. Rev contemp Pharmacother, 1999; 10: 147－153.

[3] White HS, Brown SD, SkeenGA, etc. The anticonvulsant topiramate displays a unique ability to potentiate GABA－mediated chloride currents[J]. Epilepsia, 1995; 36(suppl3): S39－S40.

[4] White HS, Brown SD, Woodhead JH, etc. Topiramateenhances GABA－mediated chloride flux and GABA－evoked chloride currents in murine brain neurons and increase seizur threhold. Epilepsia Res, 1997; 28: 167－179.

[5] 梁建辉，陆　颖，王小平，等. 氟西汀与米安舍林对小鼠自主活动探究和攻击行为药理作用的比较[J]. 中国药理学与毒理杂志，2001; 15(6): 423－426.

[6] 王小平，梁建辉，陆　颖，等. 米帕明和丁螺环酮抗隔离小鼠攻击行为的药理作用[J]. 中华精神杂志，2002; 35(1): 28－31.

[7] 徐叔云，卞如濂，陈　修. 药理实验方法学[M]. 北京：人民卫生出版社，2002; 814－815.

[8] 徐叔云，卞如濂，陈　修，主编. 药理实验方法学[M]. 北京：人民卫生出版社，1991; 645－646.

[9] 周　明，刘艳霞，杨志宏，等. 托吡酯对大鼠杏仁核点燃的抑制作用[J]. 中国药理学通报，2002; 18(1): 58－60.