维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2002)01-0005-04

细胞凋亡及凋亡相关基因在下肢静脉曲张中的表达及意义

乔正荣，时 德
（重庆医科大学临床学院血管外科 重庆 400016）

【摘 要】目的：探讨细胞凋亡和凋亡相关基因在下肢静脉曲张中的表达及意义。方法：采用凋亡细胞原位检测、原位杂交、免疫组化研究83 例曲张静脉和10 例对照组内皮细胞和平滑肌细胞凋亡及相关基因表达。结果：①曲张静脉囊性扩张型Ecs 及SMC 凋亡指数显著增高($P<0.01$)；②曲张静脉囊性扩张型Bcl-2 mRNA 阳性细胞表达率均显著低于非囊性扩张型($P<0.05$)；③非囊性扩张型其Bcl-2 基因蛋白阳性细胞表达率均显著高于囊性扩张型和对照组(P 均<0.05)；④囊性扩张型其Bax 和Fas 基因蛋白阳性细胞表达率均显著高于非囊性扩张型和对照组(P 均<0.05)；⑤Bcl-2 mRNA 表达阳性细胞数和表达率(0.25 ± 0.23) 与Bcl-2 基因蛋白(0.30 ± 0.27) 呈显著正相关，相关系数 r 分别为0.795381(P = 0.001981) 和0.688216 (P = 0.000844)。结论：①细胞过度凋亡导致静脉血管重塑、可能是静脉曲张发病机制之一；②曲张静脉囊性扩张型其ECs 和SMC 过度凋亡可能与 Bcl-2 mRNA、Bcl-2 蛋白低水平表达及 Bax、Fas 高水平表达相关。

【关键词】静脉曲张；细胞凋亡；凋亡基因
【中国图书分类法分类号】R654 【文献标识码】A 【收稿日期】2001-06-19

The expression and significance of cell apoptosis and apoptosis genes of varicosity in the lower extremities

QIAO Zhengrong, et al
(Vascular Surgery Research Institute, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: Exploring the expression and significance of cell apoptosis and apoptosis genes of varicosity in the lower extremities. *Methods*:By using TUNEL, hybridization in situ, immunohistochemical method, 83 patients with varicosity and 10 controls were studied.*Results*: Apoptosis index of ECs and SMC in cystic dilatations were compared with those of non-cystic dilatations and controls with significant difference ($P<0.01$). The numbers and index of Bcl-2 mRNA positive ECs and SMC expression were greatly lower in cystic dilatations than those in non-cystic dilatations ($P<0.05$). Bcl-2 mRNA expression in non-cystic dilatations were markedly higher than that in controls ($P<0.05$). The numbers and index of protein Bcl-2 positive Ecs and SMC were significantly increased in non-cystic dilatations compared with those of cystic dilatations and control ($P<0.05$). The numbers and index of protein Bax and Fas positive expression increased markedly in cystic dilatations compared with those of non-cystic dilatations and control ($P<0.05$). Expressions of Bcl-2 mRNA were positively correlated with that of protein Bcl-2 (r=0.795381,P=0.001981). *Conclusion*: Over-apoptosis led to venous remode-ling may be one of the mechanism of varicosity. Over-apoptosis of ECs and SMC in cystic dilatations may correlate with low level expression of Bcl-2 mRNA and protein, high level expression of Bax, Fas and ratio of Bcl-2/Bax.

【Key words】Varicosity; Cell apoptosis; Apoptosis genes

下肢静脉曲张是外科的常见病，发病率为20 % - 40%[1]，其确切的病因及发病机理仍不清楚，近年来，细胞异常凋亡可能与静脉薄弱和曲张有关而受到重视。本研究采用凋亡细胞原位检测、原位杂交和免疫组化研究曲张静脉内皮细胞(endothelial cell, EC) 和平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC) 凋亡及相关基因的调控，为阐明下肢静脉曲张发生机理和治疗提供分子生物学依据。

1 资料和方法

1.1 研究对象

随机选择我院经静脉造影、超声多谱勒和ECT 确诊的下肢静脉曲张患者83 例，男48 例，女35 例。年龄18 - 77 岁、平均51.06 ± 13.40 岁。病程为1 - 45 年，平均16.55

作者介绍：乔正荣（1964- ），男，副教授，博士。
主要研究方向：普通外科及血管外科。

维普资讯 http://www.cqvip.com

±11.60 年。主要症状和体征表现为患肢浅静脉曲张(83/83)，小腿胀痛 (52/83)，轻度肿胀(31/83)，足靴区色素沉着(39/83)、静脉性溃疡(21/83)。另随机选择10 例正常浅静脉作对照组，男6 例，女4 例。平均27 ~ 60 岁，平均49.50 ±12.03 岁。病例选择时，凡有下肢严重水肿，血栓性静脉炎、静脉血栓形成、动脉疾病及糖尿病者均于排除。

1.2 主要试剂

Bcl-2 原位杂交检测试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)；原位细胞凋亡检测试剂盒(德国BM 公司)；SP 试剂盒(北京中山生物技术有限公司)；Fas 抗体，Fas L 抗体(Santa Cruz 公司)

1.3 检测方法

1.3.1 标本分组 实验组：标本分别取自术中所见非囊性曲张静脉部位和囊性曲张静脉部位各5 ~ 10cm。对照组：正常浅静脉切取3 ~ 5cm，生理盐水冲洗后，10% 中性甲醛固定。

1.3.2 凋亡细胞的原位检测 采用末端脱氧核糖核苷酸转移酶介导的带荧光的dUTP 缺口末端标记法(TdT-mediated dUTP nick end labeling, TUENL)，原位标记凋亡细胞核中的DNA 片断3'-OH 末端，显示曲张静脉EC 和SMC 凋亡的存在。检测按文献 [2,3] 方法进行。

1.3.3 Bcl-2 mRNA 原位杂交检测 按武汉博士德生物工程有限公司试剂盒说明书进行。

1.3.4 Bcl-2/Bax 和Fas/Fas L 基因蛋白表达的检测 采用过氧化物酶标记的链霉卵白素(streptavidin/peroxidase, SP) 免疫组化染色方法[4,5]。

1.3.5 凋亡细胞计数 正常EC 和SMC 核呈蓝色，而凋亡阳性细胞核呈棕黄色，在光学显微镜下计数5 个高倍视野(high power field, HPF. ×400) 中凋亡阳性细胞核数目及其占总细胞核数目的比值(凋亡指数apoptosis index, AI)，求其均值。

1.3.6 凋亡相关基因mRNA 和基因蛋白表达阳性细胞计数

光学显微镜下计数5 个高倍视野中Bcl-2 mRNA 和Bcl-2/Bax Fas/Fas L 阳性EC、SMC 数目及其占总细胞的比例，求其均值。阳性Bcl-2 mRNA 的细胞浆着色呈棕黄色。阳性Bcl-2/Bax 或 Fas/Fas L 基因蛋白的细胞浆着色呈棕黄色。

1.4 统计学处理

数据采用Statistica ver 5.0 统计软件，由计算机处理，结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示，$P<0.05$ 为显著性意义。

2 结 果

2.1 曲张静脉囊性扩张型和非囊性扩张型EC 及SMC 凋亡的变化(表 1)

表 1 曲张静脉囊性扩张型和非囊性扩张型内膜和中膜 EC 及 SMC 凋亡的变化 ($\bar{x}\pm s$)

组 别	n	内膜 AI	中膜 AI
囊性扩张型	38	0.68 ± 0.23*	0.67 ± 0.12*
非囊性扩张型	22	0.33 ± 0.13	0.07 ± 0.06
对照组	10	0.06 ± 0.03	0.05 ± 0.02
F		32.66	169
P		< 0.01	< 0.01

与非囊性扩张型和对照组比较 *P < 0.01

曲张静脉囊性扩张型内膜和中膜EC 及SMC 凋亡指数均显著高于非囊性扩张型和对照组(P < 0.01)(见图 1)。

表 2 囊性扩张型和非囊性扩张型 EC 及 SMC 细胞 Bcl-2 mRNA 和基因蛋白的表达 ($\bar{x}\pm s$)

组 别	n	Bcl-2 mRNA 阳性细胞数/HPF	Bcl-2 mRNA 阳性细胞数/总细胞数	Bcl-2 蛋白 阳性细胞数/HPF	Bcl-2 蛋白 阳性细胞数/总细胞数
囊性扩张型	38	4.71 ± 3.40*	0.09 ± 0.06*	9.75 ± 9.07*	0.16 ± 0.09*
非囊性扩张型	22	21.80 ± 11.98**	0.41 ± 0.17**	27.38 ± 20.85**	0.44 ± 0.31**
对照组	10	2.50 ± 2.38	0.07 ± 0.58	5.38 ± 3.29	0.10 ± 0.08
F		11.03	17.28	6.17	6.91
P		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

与非囊性扩张型比较 *P<0.05，与囊性扩张型和对照组比较 **P< 0.05。

表 3 囊性扩张型和非囊性扩张型 EC 及 SMC 细胞 Bax 和 Fas 基因蛋白表达 ($\bar{x}\pm s$)

组 别	n	Bax 阳性细胞数/HPF	Bax 阳性细胞数/总细胞数	Fas 阳性细胞数/HPF	Fas 阳性细胞数/总细胞数
囊性扩张型	38	28.00 ± 12.18*	0.56 ± 0.28*	22.00 ± 12.83*	0.39 ± 0.15*
非囊性扩张型	22	10.75 ± 5.60	0.21 ± 0.12	8.50 ± 2.65	0.16 ± 0.07
对照组	10	4.13 ± 2.75	0.06 ± 0.27	4.50 ± 4.04	0.06 ± 0.06
F		19.48	17.14	5.37	10.90
P		<0.01	< 0.01	<0.05	<0.01

与非囊性扩张型和对照组比较 *P < 0.05

维普资讯 http://www.cqvip.com



图 1 囊性扩张型 EC 及 SMC 凋亡，TUNEL，200×

2.2 曲张静脉囊性扩张型和非囊性扩张型EC、SMC 细胞Bcl-2 mRNA 和基因蛋白表达的变化（表 2）

曲张静脉囊性扩张型Bcl-2 mRNA 和基因蛋白表达阳性细胞数和阳性细胞表达率均显著低于非囊性扩张型（$P < 0.05$），同时，非囊性扩张型Bcl-2 mRNA 和基因蛋白表达阳性细胞数和表达率显著高于对照组（$P < 0.05$）（图 2，图 3）。



图 2 非囊性扩张型 EC 及 SMC Bcl-2 mRNA 阳性表达，原位杂交 200×

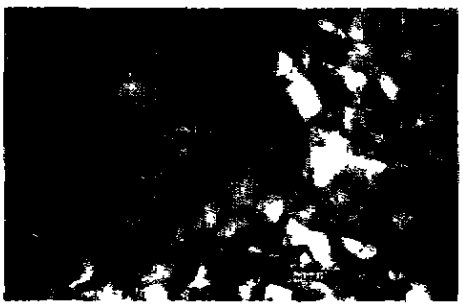


图 3 非囊性扩张型 SMC Bcl-2 基因蛋白阳性表达、SP 400×

2.3 曲张静脉囊性扩张型和非囊性扩张型EC 及 SMC 细胞 Bax 和 Fas 基因蛋白表达的变化（表 3）

囊性扩张型Bax 和Fas 基因蛋白阳性细胞数和阳性细胞表达率均显著高于非囊性扩张型和对照组（P 均 < 0.05）（图 4，图 5）。

2.4 Bcl-2 mRNA 和Bcl-2 基因蛋白表达的相关分析

Bcl-2 mRNA 表达阳性细胞数和表达率（分别为 12.75 ± 12.85 和 0.25 ± 0.23）与Bcl-2 基因蛋白（分别为 18.00 ± 15.6 和 0.30 ± 0.27）呈显著正相关，相关系数 r 分别为 0.795381（P =0.001981）和 0.688216（P =0.000844）。



图 4 囊性扩张型 EC 及 SMC Bax 基因蛋白阳性表达，SP 200×

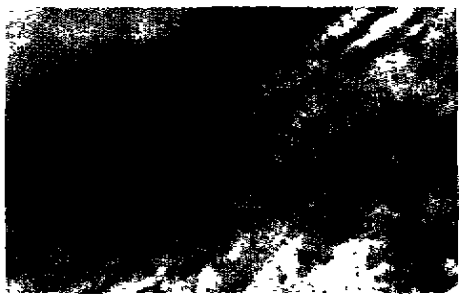


图 5 囊性扩张型 EC 及 SMC Fas 基因蛋白阳性表达，SP 400×

3 讨 论

3.1 细胞凋亡在下肢静脉曲张中的作用

正常情况下，细胞凋亡为一种生理性程序性细胞死亡途径，但在许多病理性刺激下也可诱导或抑制成熟细胞发生凋亡，造成细胞凋亡过多或不足而导致疾病的发生。近年研究发现细胞凋亡与动脉粥样硬化，血管成形术后再狭窄和大隐静脉移植物狭窄阻塞等密切相关[6,7]，对细胞凋亡和静脉曲张的研究，国内外尚未见报道。本实验显示，曲张静脉内膜和中膜囊性扩张型，其EC 及SMC 凋亡指数均显著高于非囊性扩张型和对照组（P<0.01），电镜超微结构观察曲张静脉EC、SMC 表现为胞质浓缩，胞核染色质凝聚、边集等凋亡的形态学特征，表明曲张静脉囊性扩张与EC、SMC 过度凋亡密切相关。分析其原因，Karsan[8]研究认为EC 凋亡是由 TNF α 作用于跨膜受体，激活鞘磷脂酶，引起鞘磷脂水解，产生胞内神经酰胺信号，作为第二信使，激活丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶途径而介导细胞凋亡，其次激活中性粒细胞释放弹性蛋白酶和PR3诱 导 EC

维普资讯 http://www.cqvip.com

凋亡、导致血管损伤。Yang 等[9]报道在弹性蛋白酶 25 或50mg/ml，蛋白酶3(PR3) 5 或10mg/ml，6 到 24h 可诱导牛肺动脉EC 出现典型DNA 梯度。而 KockX[10]等报道、TNF α、IL-1 β等细胞因子可增加SMC 上Fas/Apo1 信号系统表达，可能使神经鞘磷脂酶活性增高、分解鞘磷酯产生酰基神经鞘氨醇，作为第二信使，激活相应蛋白激酶，诱导 SMC 凋亡。

3.2 凋亡相关基因的表达及意义

细胞凋亡涉及多种相关基因的复杂调控，本文在探讨曲张静脉EC 及SMC 凋亡变化规律的基础上，进一步研究其凋亡相关基因mRNA 和蛋白表达的变化，以探讨曲张静脉细胞凋亡可能的分子生物学机制。本研究表明曲张静脉囊性扩张型Bcl-2 mRNA 和基因蛋白表达阳性细胞数和阳性细胞表达率（分别为4.71 ± 3.40，9.75 ± 9.07 和9 ± 6%、16 ± 9%）均显著低于非囊性扩张型（分别为21.80 ± 11.98，27.38 ± 20.85 和41 ± 17%、44 ± 31%）（P <0.05）而Bax 基因蛋白阳性细胞数和阳性细胞表达率（分别为28.00 ± 12.18 和56 ± 28%）均显著高于非囊性扩张型和对照组（分别为10.75 ± 5.60，4.13 ± 2.75 和21 ± 12%、6 ± 7%）（P 均< 0.05）。结果说明曲张静脉囊性扩张型其EC 和SMC 过度凋亡可能与Bcl-2 mRNA 和基因蛋白低水平表达及Bax 基因高水平表达和Bcl-2/Bax 比率有关，Bcl-2 mRNA 表达阳性细胞数和表达率与Bcl-2 基因蛋白表达呈显著正相关，相关系数 r 值分别为 0.795381（P =0.001981）和0.688216（P =0.000844）。结果表明Bcl-2 基因对凋亡的调节可能是一种转录性调节，主要依赖mRNA 和蛋白质的合成。其细胞凋亡机制是：当信号传递至连接分子(PAIDD 或 FLICE) 激活CED-3/caspase、导致线粒体膜通透性改变，细胞色素C(Cytochrome C, Cyt C) 和凋亡诱导因子(apoptosis inducing factor, AIF) 从线粒体释放入胞质、引起细胞结构改变和死亡，Cyt C 和 AIF 在细胞凋亡中起决定性作用。Bcl-2 基因蛋白通过抑制CED-4 而阻止CED-3/caspase 的活性，从而阻止Cyt C 和AIF 的释放，抑制细胞凋亡[11]，Bax 是Bcl-2 的同种蛋白，为21KD 蛋白，Bax 与Bcl-2 结合形成同型二聚体或异型二聚体，Bax 和Bcl-2 比例决定细胞命运，Bax 占多数则Bcl-2 被抑制，细胞凋亡，Bax 被抑制细胞得以生存、Bax 的表达并不直接阻断凋亡，但抑制和拮抗Bcl-2 的功能，通过Bcl-2-Bax 复合物或其它Bcl-2 作用靶的竞争来实现的[12]。其变化的确切机制尚待进一步研究。

Fas 基因(APO-1) 是存在于细胞表面的一种膜受体蛋白，属于肿瘤坏死因子(TNF)、神经生长因子(NGF) 受体家族，FasL 是分子量约为40KD 的Ⅱ型膜蛋白，属于TNF 家族成员，主要在激活的T 淋巴细胞，CD^{+}_{4} T 细胞、CD^{+}_{8}细胞中表达[13,14]。研究表明[15]细胞表面的FasL 与细胞Fas 抗原相互作用可诱导表达Fas 抗原的细胞发生凋亡，Fas/FasL 系统在诱导细胞凋亡，参与免疫调节中具有重要意义、本研究表明曲张静脉囊性扩张型Fas 基因蛋白阳性细胞数和阳性细胞表达率（分别为22.00 ± 12.83 和39 ± 15%）均显著高于非囊性扩张型和对照组（分别为8.50 ± 2.65、4.50 ± 4.04 和16 ± 7%、6 ± 6%）（P 均<0.05），结果说明Fas 基因可能也参与调节EC 和SMC 凋亡，EC 凋亡是由TNF-α作用于跨膜受体，引起鞘磷脂水解，产生胞内神经酰胺信号途径实现的，而TNF α、IL-1 β等细胞因子增加 SMC 上Fas/FasL 信号系统表达，通过激活caspase 诱导SMC 凋亡，但其胞内信号传递通路、尚待深入研究。

参 考 文 献

[1] Taheri SA. Surgical treatment of postphletitic syndrome with vein valve transplant[J]. Am J Surg, 1982;144(4):221-225.

[2] Gavrieli Y, Shevman Y, ben-sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation[J]. J Cell Biol, 1992;119:493-498.

[3] Wijsman JM, Jonker PR, Keijzer R, et al. A new method to detect apoptosis in paraffin section[J]. J Histochem Cytochem 1993;41:7-12.

[4] Oltrai ZH, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programed cell death. Cell, 1993; 79: 609-612.

[5] Krajewski S, Krajewska M, Shabaik A, et al. Immunohistochemical determination in vivo discontribution of Bax,a dominate inhibitor of Bcl-2[J]. Am J Pathol, 1994;145:1323-1327.

[6] Geng YJ, Libby P. Evidence for apoptosis in advanced human atheroma colocalization with interleukin-1 beta-converting enzyme[J]. Am J Pathol, 1995;147(2):251-255.

[7] Bennett MR, Eran GZ, Schwatz SN, Apoptosis of human vascular smooth muscle cells derived from normal vessels and

（下转第 11 页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

子量约33KD；而对照空质粒在相同位置未见特异蛋白表达带。经灰度扫描测定表达的目的蛋白约占菌体总蛋白的 30%。SDS-PAGE 检测结果见图 4。

3 讨 论

肝再生增强因子（Augmenter of Liver Regeneration, ALR）是1994 年Hagiya 等发现的与肝再生有关的因子。大鼠体内实验中发现肝部分切除后ALR 具有显著增强肝细胞DNA 合成的作用。我们实验室已克隆出人ALR 编码区cDNA、并构建了人ALR 的原核及真核表达重组质粒[3]。由于目前关于ALR 研究尚处于早期、其促肝再生的机制还不清楚，而且当前国内外学者对于ALR 的研究结果还有一些不统一的地方，其中包括rrALR 与rhALR 在体外活性方面的差异。因而对于ALR 的研究还需更加深入进行。因此我们克隆了大鼠ALR 编码区cDNA 并构建其原核表达重组质粒以获取rALR 蛋白，以求进一步研究 ALR 的生物学功能。

Hagiya 报道的ALR 是在大鼠2/3 肝叶切除后的新生肝组织中得到的，而幼年动物肝脏正是生长旺盛时期，其ALRmRNA 含量估计也较高，因此我们选用了以大鼠乳鼠的肝脏为组织来源提取肝脏总RNA 作逆转录及第一链cDNA 合成的模板；以RT-PCR 我们顺利克隆出了rALR 编码区cDNA，其序列与 Hagiya 报道的完全一致。

pET32a 是表达融合蛋白的原核表达质粒，插入的外源基因与本身带有的硫氧环蛋白进行融合表达、而最重要的是以pET32a 表达的蛋白含6 × 组氨酸接头，易于用多聚组氨酸纯化系统进行高效的亲合层析纯化。我们的实验结果也表明pET32a-rALR 在大肠杆菌BL21 中获得了高效表达，表达蛋白占菌体总蛋白的 30 %。

由于与硫氧环蛋白融合表达的外源蛋白大多数情况下均能正常的折叠，因而表达的重组rALR 融合蛋白能够表现出全部生物学活性[4]；即使有影响，也可以用肠激酶对介于硫氧环蛋白与目的蛋白之间的肠激酶位点进行特异性的消化而被去掉异源氨基酸，因此推测该融合蛋白可以用于rALR 的生物学功能研究。

大鼠ALR 编码区cDNA 的克隆及rALR 在大肠杆菌的高效表达，为ALR 的深入研究奠定的基础。

参 考 文 献

[1] Hagiya M D, Francavilla A, Polimeno L, et al. Cloning and sequence analysis of the rat augmenter of liver regeneration (ALR) gene: Expression of biologically active recombinant ALR and demonstration of tissue distribution[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1994;91:8142-8146.

[2] 刘 杞、王志毅，张定凤，等. 人肝再生增强因子阅读框的cDNA 克隆和序列分析[J]. 中华肝脏病杂志，1999; 7 (3):156-158.

[3] 刘 杞，石小枫. 重组人肝再生增强因子原核表达载体的构建及其在大肠杆菌中的表达[J]. 中华肝脏病杂志、2000;8(1):9-11.

[4] F 奥斯伯. 精编分子生物学实验指南[M]，第1 版，北京：科学出版社，1998;652.

（上接第 8 页）

coronary atherosclerotic plaques[J]. J Clin Invest, 1995;95:2266-2270.

[8] Karsan A, Yee E, Harlan JM. Endothelial cell death induced by tumor necrosis factor-alpha is inhibited by the Bcl-2 family member[J]. Ai.J Biol Chem, 1996; 271 (44): 27201-27206.

[9] Yang JJ, Kettritz R, Panel Falk RJ, et al. Apoptosis of endothelial cells induced by the neutrophil serine proteases proteinase 3 and elastase[J]. Am J Pathol, 1996;149(5);1617-1620.

[10] Koçkx MM, Cambier BA and Bortiex HE, et al. Roam cell replication and smooth muscle cell apoptosis in human saphenous vein grafts[J]. Histopathology, 1994; 25(4):365-367.

[11] Pierre Golstein. Controlling cell death[J]. Science, 1997;275 (21):1081-1082.

[12] Reed JC. Bcl-2 and regulation of programmed cell death[J]. J Cell Biol, 1994;124:1-3.

[13] Watanabe FR, Brannan CI, Itoh N, et al. The CDNA structure,expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen[J]. J Immunol, 1992;148:1274-1276.

[14] Suda T, Okzaki T, Naito Y, et al. Expression of the Fas ligand in cells of T cell Lineage[J]. J Immunol, 1995;154:3806-3811.

[15] Yamamoto K, Sakoda H, Na kajima T, et al. Accumulation of multiple T cell clonotypes in the synovial lesion of patients with rheumatoid arthritis revealed by a novel clonality analysis [J]. Int Immunol, 1992; 4:1219-1223.