维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2001)01-0010-04

自发性高血压大鼠细胞凋亡相关基因蛋白的研究

李法琦，陈运贞

（重庆医科大学临床学院心血管内科 重庆 400016）

【摘 要】目的：研究自发性高血压大鼠(SHR)心肌细胞Bax和Bcl-2基因蛋白表达的变化及其与心肌细胞凋亡的关系。方法：采用免疫组化和末端脱氧核糖核苷酸转移酶介导的dUTP缺口末端标记(TUNEL)法检测Bax和Bcl-2基因蛋白及凋亡细胞。结果：(1)心肌细胞凋亡和Bax基因蛋白表达在1月龄SHR组(NLVH组)和18～20月龄SHR组(CHF组)显著增高且Bax基因蛋白表达与心肌细胞凋亡呈显著正相关(P均<0.01)。(2)在10月龄SHR组(LVH组)，心肌细胞凋亡显著降低但Bcl-2基因蛋白表达显著增高且Bcl-2基因蛋白表达与心肌细胞凋亡呈显著负相关(P均<0.01)。(3)NLVH组和CHF组Bcl-2/Bax比例显著降低，但LVH组Bcl-2/Bax比例显著增高且Bcl-2/Bax比例与心肌细胞凋亡呈显著负相关(P均<0.01)。结论：SHR心肌细胞Bax和Bcl-2基因蛋白表达及心肌细胞凋亡存在动态变化，且Bax基因蛋白表达上调可能与SHR心肌细胞凋亡增加和CHF相关而Bcl-2基因蛋白表达上调则可能与SHR心肌细胞凋亡减少和LVH有关。因此，Bax和Bcl-2基因蛋白表达的动态变化可能在SHR心肌细胞凋亡和心脏重构中起重要作用。

【关键词】高血压；细胞凋亡；Bax基因；Bcl-2基因

【中国图书分类法分类号】R329.27 【文献标识码】A 【收稿日期】2000-08-28

The study of apoptosis-associated genes protein in spontaneously hypertensive rats

LI Fa-qi, et al

（Department of Cardiology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University, 400016）

【Abstract】 *Objective*: To study the dynamic changes of Bax and Bcl-2 genes protein expression in cardiomyocytes and the relationship between the changes and cardiomyocyte apoptosis in spontaneously hypertensive rats (SHR). *Methods*: Bax and Bcl-2 genes protein expression and cardiomyocyte apoptosis were tested by immunohistochemical method and in situ TdT-mediated dUTP nick end labeling(TUNEL). *Results*: (1) The cardiomyocyte apoptosis and Bax gene protein expression were notably increased in 1-month-old SHR group (NLVH group) and 18～20-month-old SHR group (CHF group) and Bax gene protein expression was positively bound up with cardiomyocyte apoptosis(all P values less than 0.01). (2)The cardiomyocyte apoptosis was significantly decreased but Bcl-2 gene protein expression remarkably increased in 10-month-old SHR group (LVH group) and Bcl-2 gene protein expression was negatively related to cardiomyocyte apoptosis (all P values less than 0.01). (3)The ratio of Bcl-2 to Bax (an inverse index of cell susceptibility of apoptosis) was markedly lowered in NLVH group and CHF group but that was outstandingly raised in LVH group and the ratio of Bcl-2 to Bax was inversely correlated with cardiomyocyte apoptosis(all P values less than 0.01). *Conclusion*: The dynamic changes of Bax and Bcl-2 genes as well as cardiomyocyte apoptosis exist in SHR, moreover, upregulation of Bax gene protein expression may be associated with the increase of cardiomyocyte apoptosis and CHF of SHR, whereas upregulation of Bcl-2 gene protein expression may be bound up with the decrease of cardiomyocyte apoptosis and LVH of SHR. Therefore, the dynamic changes of Bax and Bcl-2 genes protein expression may play an important role in cardiomyocyte apoptosis and heart remodeling of SHR.

【Key words】 Hypertension; Apoptosis; Bax gene; Bcl-2 gene

细胞凋亡与高血压病等多种心血管疾病相关[1]。然而，细胞凋亡相关基因在高血压心肌细胞凋亡中的调控作用目前尚不清楚。因此，本文采用免疫组织化学染色[2,3]和末端脱氧核糖核苷酸转移酶介导的dUTP缺口末端标记（TUNEL）[4,5]方法探查自发性高血压大鼠(SHR)心肌细胞Bax和Bcl-2基因

作者介绍：李法琦（1956- ），男，副教授，博士

维普资讯 http://www.cqvip.com

蛋白表达的变化及其与心肌细胞凋亡的关系，以期为阐明高血压心肌细胞凋亡的分子生物学机制提供部分实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SHR购自中国医学科学院阜外心血管病研究所实验动物中心；WKY大鼠购自重庆医科大学实验动物中心。

1.2 实验动物分组

将SHR分为①1月龄SHR组（n=6，雌雄各半），无左心室肥厚（无左心室肥厚组，NLVH组）；②10月龄SHR组（n=6，雌雄各半），有明显左心室肥厚（左心室肥厚组，LVH组）；③18～20月龄SHR组（n=5，雄性3，雌性2），有显著左心室肥厚伴心动过速、呼吸急促、腹腔积液、胸膜心包积液、心房血栓和右心室肥厚（充血性心力衰竭组，CHF组）；每组均等数按鼠龄、体重及雌雄配对配予WKY大鼠作对照。

1.3 心肌细胞凋亡检测与半定量分析

用改良的TUNEL法[1,3]原位标记心肌凋亡细胞核中的脱氧核糖核苷酸片段3'OH末端显示心肌凋亡细胞的存在。正常心肌细胞核呈蓝色，而凋亡阳性心肌细胞核呈棕黄色。半定量分析：在光学显微镜下计数5个高倍视野(HPF，放大400倍)中凋亡阳性心肌细胞核数目及其占总细胞核数目的比例，求其均值。

1.4 Bax和Bcl-2基因蛋白表达检测与半定量分析

采用免疫组化法检测Bax和Bcl-2基因蛋白表达[2,3]。Bax和Bcl-2基因蛋白表达均位于心肌细胞浆，表达阳性的心肌细胞DAB显色其胞浆呈棕黄色。半定量分析：光镜下计数5个HPF（放大400倍）中Bax或Bcl-2阳性心肌细胞数目及其占总细胞数目的比例，求其均值。

1.5 统计学分析

多组间比较用F检验，多组间两两比较用Newman-Keuls检验，不同变量间的相互关系用直线回归分析。实验数据用$\bar{x}\pm s$表示。

2 结 果

2.1 不同年龄SHR和WKY心肌细胞凋亡的变化

1月龄SHR（NLVH）组和18～20月龄SHR(CHF)组心肌细胞凋亡显著高于同龄WKY组和10月龄SHR(LVH）组(P均<0.01)。10月龄SHR(LVH)组心肌细胞凋亡显著低于同龄WKY组（P<0.01）。见表1。

表1 不同年龄SHR和WKY心肌细胞凋亡的变化($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	阳性细胞核/HPF	阳性细胞核/总细胞核(%)
1月龄SHR(NLVH)组	6	269.70±42.49*★	38.43±10.73*★
1月龄WKY组	6	32.83±21.09	4.12±2.03
10月龄SHR(LVH)组	6	16.07±10.83▲	2.16±1.29▲
10月龄WKY组	6	41.13±22.85	5.51±2.25
18～20月龄SHR(CHF)组	5	282.12±40.19■★	43.93±11.51■★
18～20月龄WKY组	5	41.40±21.61	6.05±2.20

与1月龄WKY组比较 * P<0.01；　与18～20月龄WKY组比较 ■ P<0.01；
与10月龄WKY组比较▲ P<0.01；　与10月龄SHR组比较★ P<0.01。

表2 不同年龄SHR和WKY心肌细胞Bax基因蛋白阳性表达的变化($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	Bax阳性细胞数/HPF	Bax阳性细胞数/总细胞数(%)
1月龄SHR(NLVH)组	6	236.53±61.21*▲	40.62±11.04*▲
1月龄WKY组	6	10.50±3.02	1.54±0.42
10月龄SHR(LVH)组	6	35.33±15.07	4.83±1.77
10月龄WKY组	6	40.32±21.77■	5.51±2.28■
18～20月龄SHR(CHF)组	5	292.20±71.15★▲	50.15±13.53★▲
18～20月龄WKY组	5	41.36±19.12■	6.22±2.09■

与1月龄WKY组比较 * P<0.01；与10月龄SHR组比较▲ P<0.01；
与18～20月龄WKY组比较★ P<0.01；　与1月龄WKY组比较■ P<0.01。

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.2　不同年龄SHR和WKY心肌细胞Bax基因蛋白阳性表达的变化及其与心肌细胞凋亡的关系

1月龄SHR(NLVH)组和18～20月龄SHR(CHF)组心肌细胞Bax基因蛋白表达显著高于同龄WKY组和10月龄SHR（LVH）组（P均<0.01）。10月龄SHR(LVH组)心肌细胞Bax基因蛋白表达略低于10月龄WKY组，但经统计学处理无显著差异($P>0.05$)。见表2。

对各组Bax基因蛋白表达阳性的心肌细胞数目与连续切片的各组凋亡阳性的心肌细胞核数目进行直线回归分析，结果显示二者呈显著正相关（$P<0.01$）。

2.3　不同年龄SHR和WKY心肌细胞Bcl-2基因蛋白阳性表达的变化及其与心肌细胞凋亡的关系

1月龄SHR(NLVH)组和18～20月龄SHR（CHF）组Bcl-2基因蛋白表达与同龄WKY组比较无显著差异（P均>0.05）。10月龄SHR（LVH）组Bcl-2基因蛋白表达显著高于10月龄WKY组、1月龄SHR（NLVH）组和18～20月龄SHR（CHF）组（P均<0.01）。见表3。

对各组Bcl-2基因蛋白表达阳性的心肌细胞核数目与连续切片的各组凋亡阳性的心肌细胞核数目进行直线回归分析，结果显示二者呈显著负相关（$P<0.01$）。

2.4　不同年龄SHR和WKY组Bcl-2/Bax比例的变化及其与心肌细胞凋亡的关系

1月龄SHR(NLVH)组和18～20月龄SHR(CHF)组Bcl-2/Bax比例显著低于同龄WKY组和10月龄SHR(LVH)组（P均<0.01）；10月龄SHR(LVH)组Bcl-2/Bax比例显著高于10月龄WKY组（$P<0.01$）。见表4。

对不同年龄SHR组Bcl-2/Bax比例与同步检测的心肌细胞凋亡指数进行直线回归分析，结果显示SHR组Bcl-2/Bax比例与心肌细胞凋亡指数呈显著负相关($P<0.01$)。

3　讨　论

细胞凋亡的发生受基因编码的调控，因此细胞凋亡相关基因在细胞凋亡中的作用倍受国内外学者的重视。高血压心肌细胞的凋亡与其它类型细胞的凋亡一样，可能也受到许多细胞凋亡相关基因的调控。

Bcl-2基因是人体的一个正常基因，属原癌基因的一种，其蛋白表达产物Bcl-2蛋白主要位于细胞的线粒体膜、核膜、溶酶体膜及内质网膜上[6]。Bcl-2基因的作用是抑制细胞凋亡，促进细胞增生和生存，延长细胞寿命[7]。Bax基因是Bcl-2基因家庭的新成员，它编码的Bax蛋白具有对抗Bcl-2蛋白抑制细胞凋亡的作用[3]，从而促进细胞凋亡。有研究表明Bcl-2/Bax两蛋白之间的比例是决定对细胞凋亡抑制作用强弱的关键因素[2,3]。然而，高血压靶器官损

表3　不同年龄SHR和WKY心肌细胞Bcl-2基因蛋白阳性表达的变化($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	Bcl-2阳性细胞数/HPF	Bcl-2阳性细胞数/总细胞数(%)
1月龄SHR(NLVH)组	6	17.00±4.51	2.48±0.87
1月龄WKY组	6	14.60±4.16	2.23±0.83
10月龄SHR(LVH)组	6	73.40±28.41*▪	9.95±3.06*▪
10月龄WKY组	6	37.43±14.84▲	5.13±1.69▲
18～20月龄SHR(CHF)组	5	44.04±15.74*	6.43±1.00*
18～20月龄WKY组	5	48.56±21.63▲	7.13±2.06▲

与10月龄WKY组比较 * $P<0.01$；与18～20月龄SHR组比较▪ $P<0.05$；
与1月龄SHR组比较 * $P<0.01$；与1月龄WKY组比较▲ $P<0.01$。

表4　不同年龄SHR和WKY Bcl-2/Bax比例的变化($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	Bcl-2/Bax
1月龄SHR(NLVH)组	6	0.16±0.06*▲
1月龄WKY组	6	1.66±0.96
10月龄SHR(LVH)组	6	2.62±1.88*
10月龄WKY组	6	1.07±0.52
18～20月龄SHR(CHF)组	5	0.14±0.06▪▲
18～20月龄WKY组	5	1.36±0.83

与1月龄WKY组比较 * $P<0.01$；与18～20月龄WKY组比较▪ $P<0.01$；与10月龄WKY组比较* $P<0.01$；与10月龄SHR组比较▲ $P<0.01$。

维普资讯 http://www.cqvip.com

害中Bcl-2基因表达的研究甚少，而Bax基因表达的变化及其与心肌细胞凋亡的关系尚不清楚。

本文结果显示SHR NLVH组和CHF组心肌细胞凋亡显著增加的同时其Bax基因蛋白表达也显著增加，且各组Bax基因蛋白表达与心肌凋亡细胞呈显著正相关，提示Bax基因表达增强可能是高血压心肌细胞凋亡的分子生物学机制之一。本文结果还显示，Bcl-2基因蛋白表达在SHR LVH组显著增加而心肌细胞凋亡却显著减少，且各组Bcl-2基因蛋白表达与心肌凋亡细胞呈显著负相关，提示Bcl-2基因蛋白表达增强可能与SHR心肌细胞凋亡不足及LVH有关。由于本文结果表明SHR NLVH组和CHF组Bax基因蛋白表达显著增强而Bcl-2 基因蛋白表达无明显变化；SHR LVH组Bcl-2基因蛋白表达显著增强而Bax基因蛋白表达无明显变化。因此，我们认为SHR NLVH组和HCF组主要是细胞凋亡诱导基因表达增强致使心肌细胞凋亡显著增加而SHR LVH组主要是细胞凋亡抑制基因表达增强引起心肌细胞凋亡显著不足和LVH。本文结果还显示，SHR NLVH组和CHF组Bcl-2/Bax比例显著降低而SHR LVH组Bcl-2/Bax比例显著增高，Bcl-2/Bax比例与心肌细胞凋亡呈显著负相关，提示Bcl-2/Bax比例在SHR心肌细胞凋亡中起重要作用。如果Bcl-2基因表达降低和（或）Bax基因表达增加，Bcl-2/Bax比例降低心肌细胞凋亡便增加，如果Bcl-2基因表达增加和（或）Bax基因表达不足，Bcl-2/Bax比例增高心肌细胞凋亡则减少[2,8]。因此，Bcl-2/Bax比例的高低可能是SHR心肌细胞是否凋亡的一个重要决定因素。由此可见，如何调控Bax和Bcl-2基因表达及其Bcl-2/Bax比例以改善SHR的心脏重构是值得进一步深入研究的课题。

关于心力衰竭时心肌细胞凋亡与Bax和Bcl-2基因表达关系的研究，国外新近也有报道，但结果并不完全一致。Li等[9]的研究表明，有心力衰竭的SHR组心肌细胞凋亡显著增加但心肌细胞Bcl-2蛋白表达与无心力衰竭的SHR组和同龄WKY组比较无显著性差异。Leri等[10]的研究发现，心室起搏所致的狗心力衰竭模型中心肌细胞凋亡显著增加的同时伴随心肌细胞Bax蛋白表达显著增加和Bcl-2蛋白表达显著降低。Olivetti等[11]的研究显示，缺血性心肌病、原发性扩张型心肌病和瓣膜性心脏病心力衰竭病人心肌组织标本中心肌细胞凋亡显著增加且Bcl-2蛋白表达阳性心肌细胞的百分率也显著增高（是正常心肌组织的1.8倍）而Bax蛋白表达阳性心肌细胞的百分率无明显变化。上述研究结果提示细胞凋亡的增减与凋亡诱导基因或抑制基因间的关系并非单一的，可能与两种基因表达程度的比值或平衡有关。不同病因和不同心功能程度的心力衰竭者 Bax和Bcl-2基因蛋白表达可能有不同的变化，有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] 李法琦. 细胞凋亡在心血管疾病中的研究现状[J]. 重庆医科大学学报，1999;24(1):103-107.

[2] Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programed cell death[J].Cell, 1993; 79: 609-619.

[3] Krajewski S, Krajewska M, Shabaik A, et al. Immunohistochemical determination of in vivo discontribution of Bax, a dominate inhibitor of Bcl-2[J]. Am J Pathol, 1994;145: 1323-1336.

[4] Wijsman HJ, Jonker RR, Keijzer R, et al. A new method to detect apoptosis in paraffin section: in situ end labeling of fragmented DNA[J].J Histochem Cytochem, 1993;41:7-12.

[5] Gold R, Schmied M, Giegerich G, et al. Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of in situ tailing and nick translation techniques[J]. Lab Invest, 1994;71:219-225.

[6] Jacobson MD, Burne JF, King MP, et al. Bcl-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA [J]. Nature, 1993; 361:365-369.

[7] 朱永宏，郭文怡. 细胞凋零在心血管系统的生理和病理意义[J]. 国外医学心血管疾病分册，1996;23:3-6.

[8] Diez J, Panizo A, Hernandez M, et al. Is the regulation of apoptosis altered in smooth muscle cells of adult spontaneously hypertensive rats[J]. Hypertension, 1997;29:776-780.

[9] Li Z, Bing OHL, Long X, et al. Increased cardiomyocyte apoptosis during the transition to heart failure in the spontaneously hypertensive rat[J]. Am J Physiol, 1997;272: H2313-H2319.

[10] Leri A, Liu Y, Malhotra A, et al. Pacing-induced heart failure in dogs enhances the expression of P53 and P53-dependent genes in ventricular myocytes[J]. Circulation, 1998; 97:194-203.

[11] Olivetti G, Abbi R, Quaini F, et al. Apoptosis in the failing human heart[J]. N Engl J Med, 1997;336:1131-1141.