DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.12.025
第22卷第12期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 12
2000年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2000

文章编号:1000-5404(2000)12-1183-03

论著

切断面神经干后大鼠面神经元 bcl-2、bax 基因表达变化及意义

杨 军,方泽强,李慧增,张从纪 (第三军医大学附属西南医院口腔科,重庆 400038)

提 要:目的 观察面神经干切断后面神经元 bcl-2、bax 基因表达与面神经元凋亡的关系。方法 采用大鼠面神经干切断模型,应用免疫组织化学方法观察面神经干切断后面神经元内 bcl-2、bax 基因表达变化和对面神经元凋亡的影响。结果 面神经干切断后可以导致 bcl-2、bax 基因表达的明显变化及面神经元的凋亡。结论 bcl-2、bax 基因参与了面神经干切断诱导的面神经元凋亡过程的调控。

关键词:bcl-2;bax;凋亡;面神经元;轴突切断;大鼠
中图法分类号:R322.8;R394.3 文献标识码:A

Changes of expression of bcl-2 and bax gene in facial neurons of rats following facial nerve axotomy

YANG Jun, FANG Ze-qiang, LI Hui-zeng, ZHANG Cong-ji (Department of Stomatology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship between the expressions of bcl-2, bax gene and apoptosis of facial neuron after facial nerve axotomy. Methods After the model of facial nerve axotomy was established in Wistar rats, the changes of bcl-2 and bax gene expressions in facial neurons and facial neuronal apoptosis were observed with immunohistochemical methods. Results Facial nerve axotomy resulted in the changes of bcl-2, bax gene expressions and facial neuronal apoptosis. Conclusion bcl-2 and bax gene might participate the process of apoptosis of the facial neuron induced by facial nerve axotomy.

Key words: bcl-2; bax; apoptosis; rat; facial neurons; axotomy

损伤周围神经可引起其源神经元胞体一系列形态学及生物化学变化,且周围神经损伤后的修复与其神经元存活状态紧密相关。近来研究表明 bcl-2 族基因与细胞凋亡的发生有密切关系[1]。本研究采用免疫组织化学方法,对切断面神经干后不同时相点的面神经元内 bcl-2、bax 基因表达及面神经元凋亡变化进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

健康 Wistar 大白鼠 60 只,雌雄各半,体重为 180~240 g,随机分为 3、7、15、21、30、60 d 时相组,每组 10 只。实验动物由第三军医大学实验动物中心提供。

主要试剂:兔抗大鼠 bcl-2 和 bax 抗体、生物素化羊抗兔 IgG 由武汉博士德生物工程公司提供。细胞凋亡测定试剂盒由德国宝灵曼公司提供。

1.2 方法

1.2.1 动物模型建立 1%戊巴比妥钠(30 mg/kg)经腹腔麻醉后暴露左侧面神经,于茎乳孔下 5 mm 处将其切断,并于远侧神经干切除 1cm 以防止神经再生。止血,缝合切口。右侧面神经干未切断为对照侧。

1.2.2 取材与制片 各组动物均在麻醉下取材。经左心室穿刺升主动脉快速灌注 37 ℃生理盐水 150 ml 及 4 ℃4%多聚甲醛 250 ml,固定后开颅取脑,取出脑组织再固定 2 h,每只动物左右水平切面切取 1 块以小脑桥延沟为中心 5 mm 厚脑组织块,用 4%多聚甲醛固定 24 h,然后移入 30%蔗糖溶液固定 12 h。25 μm 连续冰冻切片,切片浸泡于 0.01 mol/L PBS 备用。

1.2.3 bcl-2 和 bax 基因表达检测 免疫组化 ABC 染色法。实验动物标本切片用 3%H_2O_2 室温孵育 15 min,再用 7.5%正常山羊血清封闭,室温孵育 30 min。加入一抗(兔抗 bcl-2-IgG 或兔抗 bax-IgG)37 ℃孵育 60 min,0.01 mol/L PBS 冲洗。加入二抗(生物素化羊抗兔 IgG)37 ℃孵育 60 min,0.01 mol/L PBS 冲洗。加入 ABC 复合物室温孵育 15 min,0.01 mol/L PBS 冲洗。DAB 显色。自来水冲洗,复染,封片。

1.2.4 面神经元凋亡观察 荧光标记的终末去氧核糖核酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记法(TdT-mediated dUTP nick end labelling, TUNEL)。实验动物标本切片用 0.1 mol/L Tris-HCl(3%BSA,20%正常牛血清)室温孵育 30 min,0.15 mol/L PBS 冲洗。加入试剂盒中的反应成份 37 ℃孵育 60 min,0.15 mol/L PBS 冲洗。切片烘干,封片。用荧光显微镜观察。

1.3 统计学处理

采用重庆大学 Tiger 计算机图像分析仪分别计算每张切片

作者简介:杨 军(1962—),男,江苏省淮安市人,硕士,副教授,主要从事口腔颌面部组织损伤方面的研究,发表论文 10 篇。电话:(023)68754114-73143

收稿日期:2000-03-15;修回日期:2000-07-28

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

左右侧面神经元内 bcl-2、bax 及凋亡神经元免疫荧光的光密度，结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示，统计处理用方差分析和 t 检验。

2 结果

正常面神经核内可见神经元有散在分布的呈棕黄色的 bcl-2、bax 基因表达及有免疫荧光反应的凋亡神经元（TUNEL 阳性细胞）。术后第 3 天，实验侧面神经核 bcl-2、bax 基因表达及 TUNEL 阳性细胞数较正常增加，第 15 天较正常明显增加，第 21 天 bcl-2、bax 基因表达及 TUNEL 阳性细胞数增加达高峰。见表 1、2 及图 1、2。

表 1 大鼠面神经干离断后面神经核内 **bcl-2、bax** 免疫组化染色光密度（$\bar{x}\pm s$）

Tab 1 Optical density of bcl-2 and bax immunohistochemical staining in nucleus of facial nerve after axotomy（$\bar{x}\pm s$）

Group	bcl-2						bax					
	3 d(n=10)	7 d(n=10)	15 d(n=10)	21 d(n=10)	30 d(n=10)	60 d(n=10)	3 d(n=10)	7 d(n=10)	15 d(n=10)	21 d(n=10)	30 d(n=10)	60 d(n=10)
Control	6.2±1.8	6.5±2.0	6.0±1.5	6.8±2.2	5.9±1.6	6.1± 1.9	15.1±4.8	15.4±4.9	14.9±4.2	15.5±4.7	15.3±4.5	15.6± 4.3
Experimental	8.1±2.8	11.3±4.2	16.7± 6.5 *	20.5±8.6 **	9.4±3.2	7.3±2.5	18.4±6.3	25.2±9.8	40.7±14.3 *	68.9±16.2 **	20.8±8.2	17.9 ±6.1

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* control

表 2 大鼠面神经干离断后面神经核内 **TUNEL** 阳性细胞（$\bar{x}\pm s$）

Tab 2 Number of TUNEL positive cells in nucleus of facial nerve after axotomy（$\bar{x}\pm s$）

Group	3 d(n=10)	7 d(n=10)	15 d(n=10)	21 d(n=10)	30 d(n=10)	60 d(n=10)
Control	1.8±0.9	1.4±0.5	1.9±1.1	1.6±0.7	1.5±0.4	1.4±0.6
Experimental	10.9±3.8	15.3±5.9	20.5±8.6 *	26.8±10.1 **	21.4±9.2	19.7±7.2

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* control

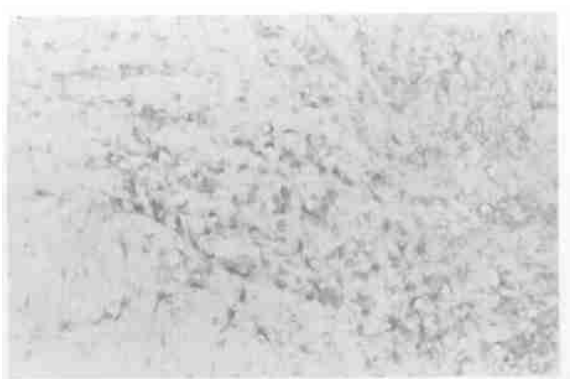


图 1 切断面神经后 **21 d, bcl-2** 在面神经元的表达 （ABC× 100）

Fig 1 Expression of bcl-2 in facial neurons 21 d after facial nerve axotomy （ABC× 100）



图 2 切断面神经后 **21 d, bax** 在面神经元的表达 （ABC× 100）

Fig 2 Expression of bax in facial neurons 21 d after facial nerve axotomy （ABC× 100）

3 讨论

我们的研究发现，面神经干切断后面神经元区术后不同时间 TUNEL 阳性细胞数都较对照侧明显增加，表明面神经干切断后能引起相应的面神经元凋亡。同时，面神经元内 bcl-2、bax 基因表达较正常增多，术后 21 d 达高峰，bcl-2/bax 变化与面神经元凋亡具有明显相关性，表明 bcl-2、bax 基因在面神经元凋亡过程中参与了调控。

包括 fas 配基、生长因子缺乏、自由基在内的许多因素能诱导细胞凋亡的发生[2]，但对凋亡的确切机制还不十分清楚。近年来，研究细胞凋亡的基因调控备受关注，其中 bcl-2 家族在细胞凋亡过程中的作用成为研究热点。bcl-2、bax 基因是 bcl-2 家族中作用完全相反的基因[3]。bcl-2 基因能够抑制多种因素诱导的细胞凋亡，可能是通过抗氧化效应[4]、阻止细胞内 Ca^{2+} 流动，使细胞膜超极化[5] 或控制细胞信号传导途径而发挥作用。bax 基因主要是通过其自身形成的 bax 同二聚体和/或与 bcl-2 形成异二聚体而调节细胞凋亡。bax 同二聚体促进细胞凋亡，异二聚体则抑制细胞凋亡[6]。细胞凋亡能否发生，决定于 bcl-2 与 bax 的严格化学定量比。

我们的研究表明，bcl-2、bax 基因在正常面神经元内均有表达，面神经干损伤后面神经元内 bcl-2、bax 基因较对照侧增多，在术后 21 d 达最高值，与对照侧相比，差异非常显著（$P<0.01$）。面神经元的凋亡在术后 21 d 达高峰，此时，bcl-2/bax 比值达最低，面神经元的凋亡与 bcl-2/bax 比值具有显著相关性（$P<0.01$）。已有研究表明[7]，周围神经损伤后，相应的神经元胞体神经传导的蛋白合成明显减少，及神经元内 5-HT_2、α_1-肾上腺素能受体、M 型乙酰胆碱受体含量降低，这也从另一方面支持我们的研究结果，即面神经干损伤后可引起面神经元的凋亡。面神经干切断后面神经元内

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

bcl-2、bax 基因的升高及 bcl-2/bax 表达比率下降，以致神经元的凋亡数增加，提示 bcl-2、bax 基因参与了面神经元凋亡过程的调控。

我们的研究还发现，面神经元凋亡在术后 21 d 达高峰，30 d 和 60 d 有所下降，但显著高于正常（$P<0.05$），然而 bcl-2/bax 比值接近正常，这可能与神经元是终端分化细胞，本身不具备分裂能力，一旦出现死亡，不能得到有效补充有关。

参考文献：

[1] Mu X, He J, Anderson D W. Altered expression of bcl-2 and bax mRNA in amyotriphic lateral sclerosis spinal cord motor neurons [J]. Ann Neurol, 1996, 40(3): 379—386.

[2] Thompson C B, Freedman J C. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease[J]. Science, 1995, 267(4): 1 455—1 457.

[3] Macaya A. Apoptosis in the nervous system[J]. Rev Neurol, 1996, 24(135): 1 356—1 360.

[4] Steinman H M, Dambrine G. The bcl-2 oncoprotein function as a pro—oxidant[J]. J Biol Chem, 1995, 270(4): 3 487—3 490.

[5] Gilbert M S, Saad A H, Rupnow B A, *et al*. Association of bcl-2 with membrane hyperpolarization and radioresistance[J]. J Cell Physiol, 1996, 168(2): 114—122.

[6] Oltvai N Z, Milliman L C, Korsmeyer J S. Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homology, bax that accelerates programmed cell death[J]. Cell, 1993, 74(1): 609—619.

[7] 吴建中, Zilles K. 切断面神经后大鼠面神经核内 5-HT_2、M_2 和 α_1-肾上腺素能受体的变化[J]. 神经解剖学杂志, 1998, 14(1): 72—74.

（编辑　冯崇英）

文章编号：1000-5404(2000)12-1185-01

经验与短篇

肝素钠盐水稀释液放置不同条件下细菌内毒素污染的调查

Survey on bacterial endotoxin contamination in normal saline diluted heparin solution under different conditions

李　清[1]，李　涛[2]，陈　雅[3]，李飞娥[4]，刘道燕[4]　（第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所：[1] 肾移植病房；[2] 护理部；[3] 药剂科；[4] 高血压内分泌科；重庆 400042）

随着静脉留置套管针在临床的广泛使用，采用肝素钠盐水稀释液封管已成为常规，其配制方法是将肝素钠 12 500 U/支加入 0.9%等渗盐水 100 ml 中，每次抽取 2～5 ml（125 U/ml）[1] 封管。据调查，临床上少数科室由于每日只有 3～5 个病人封管，护理人员为了节约经费，将稀释液放置于冰箱中保存使用 2～3 d 或更长的时间。为了进一步探讨该稀释液使用中的安全性，本实验将肝素钠盐水稀释液配制后，通过不同的穿刺抽液次数、置于不同温度中，于不同的时间用鲎试剂法对细菌内毒素（热原）进行检测，现报告如下。

1　材料与方法

1.1　试剂与器材

鲎试剂（湛江海洋生物制品厂，0.5 U/支，批号 991202）；鲎试剂溶解水（厦门鲎试剂厂 2 ml/支，批号 000110）；细菌内毒素工作标准品（厦门溶解试剂厂，10U/支）；肝素钠（上海生物化学制药厂，12 500 U/支批号 001006）；等渗盐水 100 ml（本院药剂科生产，批号 000512）。电热恒温水浴箱，B-D 5 ml 一次性空针（6 号针头）。

1.2　方法

1.2.1　样本分组及采样时间　配制 125 U/ml 浓度的肝素钠盐水稀释液 120 瓶，根据采样时间不同分为 12、24、48、72 h 4 组，每组 30 瓶。4 组中再根据放置温度（4 ℃、25 ℃）分为 2 个亚组，每亚组各 15 瓶，以观察不同的温度对稀释液产生细菌内毒素的影响。亚组 15 瓶中再根据穿刺抽液次数不同分为 3 个观察组（5、10、20 次组）各 5 瓶，以观察不同的抽液次数对产生细菌内毒素的影响。

1.2.2　细菌内毒素检测　每瓶稀释液检测时，均取鲎试剂 4 支，分别用 0.1 ml 鲎试剂溶解水溶解，其中 2 支分别加入 0.1 ml 待测液作为试验管，另 2 支作阳性及阴性对照，阳性对照加内毒素工作标准品溶液 0.1 ml，阴性对照加细菌内毒素检查用水 0.1 ml。将试管溶液轻轻混匀后，封闭管口，垂直放入（37±1）℃水浴箱中，保温（60±2）min，观察结果。

1.2.3　判断标准　将试管从水浴箱中轻轻取出，缓缓倒转 180°时，管内凝胶不变形，不从管壁滑脱者为阳性（＋）；凝胶不能保持完整并从管壁滑脱者为阴性（－）。试验管两管均为（－），判定为无内毒素产生；如两管均为（＋），则判定为内毒素

（下转 1188 页）

作者简介：李　清（1965－），女，重庆市人，主管护师。电话：（023）68757724

收稿日期：2000-07-05；修回日期：2000-09-30

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net