DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.02.009
第23卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 2
140 2001年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)02-0140-03

低氧性肺动脉高压大鼠肺组织相关凋亡基因表达的研究

王关嵩,钱桂生,赵志强,姚 伟 (第三军医大学附属新桥医院全军呼吸内科研究所,重庆 400037)

提 要:目的 探讨bcl-2、bax、Fas、FasL凋亡相关基因在低氧肺动脉高压大鼠肺组织中的表达及其与发病的关系。方法 60只Wistar大鼠随机分为5组:正常对照组;低氧肺动脉高压组;血晶素组;锡原卟啉组;低浓度CO组;每组12只。采用组织的原位细胞凋亡、DNA片段检测,免疫组织化学染色,原位杂交等方法进行检测。结果 低浓度CO组和血晶素组肺组织有典型的DNA梯带,bcl-2、bax、Fas、FasL免疫组化显示的表达呈强棕黄色,比低氧组均显著升高,原位杂交可见,低浓度CO组和血晶素组肺内支气管和小血管壁细胞胞浆呈强的紫蓝色,bcl-2表达呈棕黄色,比低氧组降低,原位杂交可见呈紫蓝色。结论 CO可以调节bcl-2、bax、Fas和FasL凋亡基因的表达,而这些凋亡基因又通过不同途径参与低氧肺动脉高压肺组织的细胞凋亡的调节,并在慢性阻塞性肺疾病的发生与发展中发挥重要作用。

关键词:低氧;肺动脉高压;凋亡;基因表达
中图法分类号:R394.2;R544.02 文献标识码:A

Expression of some apoptosis-related genes in the lung tissues of rats with hypoxic pulmonary hypertension

WANG Guan-song, QIAN Gui-sheng, ZHAO Zhi-qiang, YAO Wei (Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To study the expressions of some apoptosis related to genes in lung tissues and their relationship to the pathogenesis in rats to hypoxic pulmonary hypertension (HPH). **Methods** A total of 60 rats were employed and equally divided into 5 groups, i.e. control, HPH, hemin, Tin Protoporphyrin (Snpp) and low concentration CO groups. Of them, the rats from middle 3 groups were treated with hypoxia under normal pressure for 7 h in every day, 3 weeks except Sunday. Hemin and Tin Protoporphyrin (Snpp) were given half an hour before hypoxia while low concentration CO after 2 h of hypoxia. The expression of bcl-2, bax, Fas and Fas ligand (FasL) were detected with immunohistochemical staining, *in situ* cell death detection, DNA fragment detection, and *in situ* hybridization. **Results** In low concentration CO and hemin group, typical DNA ladder bands and apoptotic cells were found in lung tissues, and the expressions of Fas, FasL, bax, and bcl-2 mRNA were increased in the epithelial cells of alveoli, vascular and bronchial walls. And the expression of bcl-2 mRNA was decreased than in hypoxic group. **Conclusion** CO can regulate the expression of bcl-2, bax, Fas and FasL, these apoptotic genes may involve in the regulation of cell apoptosis of lung tissues under HPH and play important roles in the genesis and development of chronic obstructive lung disorders.

Key words: hypoxia; pulmonary hypertension; apoptosis; gene expression

细胞凋亡又称程序性细胞死亡,它与坏死不同,不引起机体局部或全身的炎症反应,诱导细胞凋亡可作为许多疾病的治疗手段已被引起重视。在bcl-2基因家族中,bcl-2是凋亡抑制基因,bax是凋亡诱导基因,二者比率是影响细胞凋亡的关键。Fas及其配体FasL相互作用也是细胞凋亡的重要途径之一。本研究利用全自动缺氧舱复制的低氧性肺动脉高压(Hypoxic pulmonary hypertension, HPH)模型,观察肺组织基因bcl-2、bax、Fas和FasL的变化,探讨HPH发病机制,为其防治提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 低氧肺动脉高压大鼠动物模型复制及分组

实验选择健康成年雄性Wistar大鼠60只,体重(200±25)g(第三军医大学实验动物中心,有合格证号),随机分为5组,每组12只。①正常对照组(Ⅰ):放在室温下依常规方法饲养。②低氧肺动脉高压组(Ⅱ):依我所方法建立常压低氧舱,保持O_2浓度为10%±0.5%,每天7 h,每周6 d,周日休息,持续3周。③血晶素组(Ⅲ):每日低氧前0.5 h时注入1次血晶素,100 μmol/kg;④锡原卟啉组(Ⅳ):每日低氧前0.5 h时注入1次锡原卟啉,100 μmol/kg;⑤低浓度CO组(Ⅴ):每日低氧2 h后通入1次调制好的50×10^{-6}的CO 15 min。

1.2 组织的原位细胞凋亡检测

先用PBS(pH 7.4)漂洗组织切片,然后4%多聚甲醛固定组织切片30 min。在相应时相点,进行原位细胞凋亡检测[1]。参照试剂盒说明书方法略加修改。取出盖玻片,0.01 mol/L PBS(pH 7.4,下同)漂洗3 min;4%多聚甲醛固定30 min;PBS漂洗3 min;室温下,0.3%H_2O_2封闭15 min;PBS漂洗2×3 min;0.1% Triton X-100 4°C通透10 min;PBS漂洗2×3 min;加入由末端脱氧核苷酸转移酶(TdT),脱氧三磷酸核苷(dNTP)和荧光素标记的脱氧三磷酸尿苷(dUTP)组成的混合液30 μl,37°C反应1 h;PBS漂洗5×5 min;荧光显微镜下观察并照像;加入过氧化物酶(POD)连接的抗荧光素抗体20 μl,37°C反应30 min;PBS漂洗3×5 min;滴加新配制的0.01%H_2O_2/0.05% DAB显色液,显微镜下观察,显色约10 min左右,清水冲洗终止反应;苏木素轻度复

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39700057)
作者简介:王关嵩(1967-),男,河南省平顶山市人,博士,主治医师,讲师,主要从事低氧肺动脉高压的机制及防治方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68755320
收稿日期:2000-07-15;修回日期:2000-09-26

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

染, 常规系列酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。光镜高倍镜(× 400)下, 观察 5 ~ 8 个视野, 计数 200 个细胞以上, 计算阳性细胞百分率。

1.3　细胞凋亡 DNA 片段检测

参考文献[2]方法并加以改进。100 mg 肺组织无菌剪刀剪碎。加裂解液 1.0 ml + 10% SDS 0.25 ml + 蛋白酶 K 50 μl(10 mg/ml), 37 ℃, 24 ~ 48 h。加等量饱和酚, 混匀 3 ~ 5 min, 8 000 r/min, 离心 10 min, 取水相加 1/2 体积饱和酚、1/2 体积氯仿/异戊醇(24∶1)混匀 3 ~ 5 min, 8 000 r/min, 离心 10 min。取水相加 2 倍体积无水乙醇, 1/10 体积的醋酸钠(3 mol/L) - 20 ℃, 2 h。1 000 r/min, 离心 20 min 以上, 弃上清, 75% 乙醇洗涤, 自然干燥, TE 溶解。电泳、观察、照相。

1.4　免疫组织化学染色

bcl-2(兔抗人, 单抗 1∶50, Santa Cruz, USA); Fas(兔抗人, 多抗 1∶20, DAKO, USA); FasL(兔抗人, 多抗 1∶50, Santa Cruz, USA); bax(兔抗人, 多抗 1∶30, Santa Cruz, USA)。

0.01 mol/L PBS(pH 7.4, 下同)漂洗 3 min; 4% 多聚甲醛固定 30 min; PBS 漂洗 3 min; 室温下, 0.3% H_2O_2 封闭 15 min; PBS 漂洗 3× 5 min; 滴加正常山羊血清 50 μl/片, 37 ℃孵育 30 min; 倒去山羊血清, 加入小鼠抗人血管平滑肌 α-actin 单抗, 37 ℃孵育 60 min; 然后 4 ℃过夜(20 h 以上); PBS 漂洗 3× 5 min; 加入生物素标记的二抗 50 μl/片, 37℃ 孵育 30 min; PBS 漂洗 3× 5 min; 加入链霉亲和素-过氧化物酶溶液 50 μl/片, 37 ℃孵育 30 ~ 60 min; PBS 漂洗 3× 5 min; 滴加新配的 0.03% H_2O_2/0.05% DAB 溶液 50 μl/片, 镜下观察显色 10 min 左右, 自来水冲洗终止反应; 苏木素复染, 中性树胶封片。0: 不表达, +: 微弱表达, ++: 中等阳性, +++: 强阳性。

1.5　原位杂交

参照文献[3]方法。取实验组及对照组动物肺组织, 主要步骤包括固定、切片、消化、预杂交、杂交、漂洗、显色、脱水、封片。

1.6　统计学处理

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析, 并作方差保护显著性检验。

2　结果

2.1　细胞凋亡检测结果

我们研究发现肺组织有典型的 DNA 梯带, 见图 1, 荧光显微镜下可见低浓度 CO 组和血晶素组肺组织均有明显的凋亡标记, 而常氧组、锡原卟啉组仅见很弱的荧光。

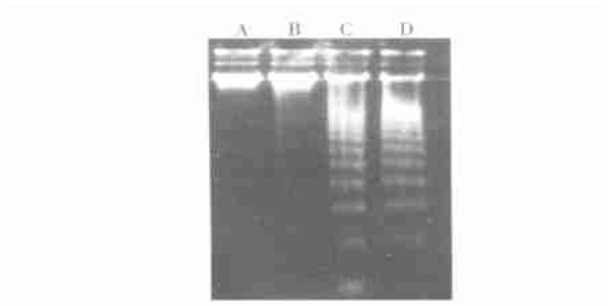


图 1　低浓度 CO 组大鼠肺组织 DNA 电泳

Fig 1　Electrophoretic analysis of DNA fragment of lung tissues in rats

A, B: Normoxia group; C, D: Low desity CO group

2.2　电镜观察

低浓度 CO 组肺动脉和肺组织中可见部分平滑肌细胞和内皮细胞及上皮细胞呈凋亡样改变, 染色质边聚, 电子密度增高, 胞浆浓缩, 核变不规则。

2.3　免疫组织化学染色结果

结果表明, 肺组织低浓度 CO 组和血晶素组 bcl-2、bax、Fas、FasL 均有升高, 主要集中于肺泡上皮细胞、支气管壁和肺小血管壁细胞。低氧组和锡原卟啉组虽然也有表达, 但程度较弱, 且 bcl-2 表达处于优势。见表 1, 图 2、3。

表 1　各组大鼠肺组织凋亡基因的蛋白质表达情况

Tab 1　The expression of apoptotic protein in lung tissues of rats

Group	bcl-2	bax	Fas	FasL
Ⅰ	0 ~ +	0 ~ +	+	0 ~ +
Ⅱ	++	+ ~ ++	+++	+ ~ ++
Ⅲ	++	+ ~ ++	++	+ ~ ++
Ⅳ	++	++ ~ ++	++	++ ~ ++
Ⅴ	++	++ ~ ++	++	++ ~ ++

Ⅰ: Control; Ⅱ: HPH; Ⅲ: Hemin; Ⅳ: Protoporphyrin; Ⅴ: Low concertration CO

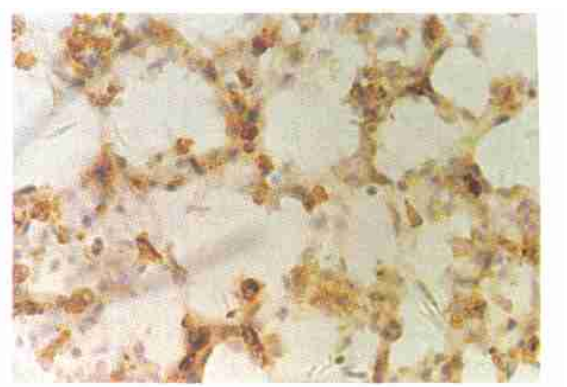


图 2　低浓度 CO 组肺组织 Fas 免疫组织化学染色
肺泡壁细胞的胞浆呈棕黄色　(SABC× 400)

Fig 2　Fas expression in pulmonary alveoli cell in low density CO group by immunohistohitochemical method

Cytoplasm of alveoli cells brownish yellow stained　(SABC× 400)



图 3　低浓度 CO 组肺组织 bax 免疫组织化学染色
肺组织支气管壁细胞的胞浆呈棕黄色　(SABC× 400)

Fig 3　bax expression in pulmonary bronchi in low density CO group by immunohistochemistry methods

Cytoplasm of bronchial wall cells brownish yellow stained　(SABC× 400)

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

2.4 原位杂交

肺组织的肺泡、支气管和小血管壁细胞胞浆，正常组 Fas 杂交可见呈微弱的紫蓝色。低氧组 bax、Fas、FasL 杂交可见呈中等强度的紫蓝色，低浓度 CO 组可见呈极强的紫蓝色；但 bcl-2 染色，可见低氧组细胞胞浆呈强的紫蓝色，低浓度 CO 组呈微弱的紫蓝色。见图 4、5。



图 4 低浓度 CO 组大鼠肺组织 **FasL mRNA** 杂交
支气管壁细胞胞浆呈紫蓝色 (ISH×400)

Fig 4 FasL mRNA expression in pulmonary bronchi in low density CO group
Cytoplasm of bronchial wall cells bluish purple stained (ISH×400)



图 5 低浓度 CO 组大鼠肺组织 **bax mRNA** 杂交
肺内小血管壁细胞胞浆呈紫蓝色 (ISH×400)

Fig 5 bax mRNA expression in pulmonary artery in low density CO group
Cytoplasm of pulmonary small vessel cells bluish purple stained (ISH×400)

3 讨论

3.1 低浓度 CO 作用后肺组织凋亡变化的基本情况

我们研究发现，低浓度 CO 作用后与低氧组比较，肺组织发生凋亡样改变，肺组织有典型的 DNA 梯带，原位凋亡检测可见大量荧光染色的细胞。

3.2 低浓度 CO 作用后对肺组织 Fas 系统的影响

我们研究发现，低浓度 CO 作用后与低氧比较，肺组织 Fas mRNA 水平和蛋白质含量均明显升高，FasL mRNA 和蛋白质的含量也有类似的改变。Fas 系统包括 Fas、FasL 及它们的可溶性形式。Fas 由胞浆区、跨膜区和胞外区 3 部分组成，属于 TNFR/NGFR 家族。Fas 胞浆区含 70 个左右对于凋亡是必不可少的氨基酸序列，称为死亡区。Fas 主要分布于活化的 T 细胞表面，属于 TNF 家族，FasL 为它的受体。如果 Fas 基因转录过程 mRNA 剪切方式发生改变，则可编码合成跨膜区不完整或缺失的可溶性 Fas，它可阻断膜 Fas 与 FasL 结合，而抑制凋亡。FasL 也可脱落或被分泌至细胞外，成为可溶性活性分子。Fas 介导细胞凋亡信号的启动需通过 Fas 的自身聚合，并通过细胞死亡区与死亡区间形成自身连接而传递死亡信号[4~6]。提示低浓度 CO 组作用后促进内源性 CO 的产生，诱导组织表达 FasL 和 Fas 自身的聚合，从而促进凋亡。

3.3 低浓度 CO 作用后对 bcl-2/bax 的影响

我们的研究发现低氧处理后肺组织 bcl-2 mRNA 水平显著升高，蛋白质含量增加，而 bax mRNA 和蛋白质表达水平稍微升高，bcl-2 的基因表达处于优势地位。bcl-2 抗细胞凋亡可能通过下列途径：①bcl-2 形成离子通道的三维空间结构，其中心是 2 个 α 螺旋 (α5, α6) 组成的发夹结构，周围围绕着 5~8 个疏水 α 螺旋，推测 2 个 α 螺旋是形成离子通道的功能单位。推测低氧 24 h 或 48 h 时 bcl-2 的功能单位完好。②bax 蛋白也能形成离子通道，与 bcl-2 不同，bax 蛋白离子通道阳离子选择性较低，在生理性 pH 下，bcl 可阻止 bax 蛋白形成离子通道。但体外实验说明它们与线粒体核膜孔开放或凋亡诱导因子 (Apoptosis inducing factor, AIF) 的释放有关。我们的研究证实，低浓度外源性 CO 和内源性 CO 可以作为凋亡的诱导因子，促进 bax 的过度表达，使其处于优势地位，形成离子通道促进凋亡。③bcl-2 过度表达可抑制线粒体核膜孔开放[7,8]，阻止细胞色素 C 的释放；bax 过度表达可促进线粒体核膜孔开放。我们利用电镜也观察到低浓度 CO 作用后，肺组织上皮细胞、肺泡壁血管平滑肌细胞和内皮细胞的线粒体有改变。提示可能通过该途径发挥作用。

参考文献：

[1] Koide N, Narita K, Kato Y, *et al*. Expression of Fas and Fas ligand on mouse renal tubular epithelial cells in the generalized shwartzman reaction and its relationship to apoptosis[J]. Infect Immun, 1999, 67(8): 4 112—4 118.

[2] Sellins K S, Cohen J J. Gene induction by γ-irradiation leads to DNA fragmentation in lymphocytes[J]. J Immunol, 1987, 139(10): 3 199—3 206.

[3] 蔡文琴，王伯弋云 主编. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术[M]. 成都：四川科学技术出版社，1994. 495—496.

[4] Los M, Van de Crean M, Penning L C, *et al*. Requirement of an ICE/CED-3 protease for Fas/ApO-1 mediated apoptosis[J]. Nature, 1995, 375(6 526): 81—83.

[5] Yeh W C, Pompa J L, McCurrach M E, *et al*. FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis[J]. Science, 1998, 279(5 358): 1 954—1 958.

[6] Pan G, Ni J, Wei Y F, *et al*. An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL[J]. Science, 1997, 277(5 327): 815—817.

[7] Zhou P, Qian L, Kozopas K M, *et al*. Mcl-1, a Bcl-2 family member, delays the death of hematopoietic cells under a variety of apoptosis-inducing conditions[J]. Blood, 1997, 89(2): 630—643.

[8] Farrow S N, White J H, Martinou I, *et al*. Cloning of a bcl-2 homologue by interaction with adenovirus E1B 19K[J]. Nature, 1995, 374(6 524): 731—733.

(编辑 薛国文)

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