

·基础研究·

# 脑出血周围组织细胞凋亡与 bcl-2 及 bax 蛋白表达的关系

李红玲<sup>1</sup> 赵鹏飞<sup>2</sup> 袁正华<sup>1</sup> 李春岩<sup>3</sup>

**摘要** 目的:探讨脑出血灶周围组织中 bcl-2, bax 蛋白表达和细胞凋亡的关系。方法:SD 大鼠 70 只,随机分为两组(实验组和对照组)。实验组采用胶原酶诱导大鼠尾状核脑出血模型,分别于术后第 6h、12h、24h、48h、72h、7d、14d、7 个时相点(每个时相点 5 只)处死大鼠,运用 TUNEL 法、免疫组化 SP 技术,检测血肿周围脑组织中细胞凋亡及 bcl-2, bax 蛋白表达。结果:实验组细胞凋亡、bcl-2, bax 蛋白表达与对照组有非常显著性差异( $P < 0.01$ ),高峰期分别为脑出血术后第 6h、48h。bcl-2 蛋白表达与凋亡阳性细胞数呈负相关( $r = -0.7628, P < 0.05$ ), bax 蛋白表达与凋亡阳性细胞呈正相关( $r = 0.8438, P < 0.01$ )。结论:脑出血灶周围脑组织中存在细胞凋亡, bcl-2, bax 蛋白对凋亡具有调控作用。

**关键词** 脑出血;细胞凋亡; bcl-2 蛋白; bax 蛋白;大鼠;胶原酶

中图分类号:R493, R741 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2007)-03-0222-03

**Apoptosis and expressions of bcl-2 and bax protein in perihematomal brain regions of rats/LI Hongling, ZHAO Pengfei, YUAN Zhenghua//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007, 22(3): 222—224**

**Abstract Objective:** To investigate the relations between the expressions of bcl-2 and bax protein and apoptosis in perihematomal brain regions of rats. **Method:** Seventy SD rats were divided randomly into two groups, experimental group and control group. A model of ICH was established by stereotactically injection of 0.5U bacterial collagenase VII into caudate nucleus in the rats. Rats in two groups were executed after 6h, 12h, 24h, 48h, 72h, 7d and 14d, respectively. TUNEL method was used to detect apoptosis, and SP method to detect expressions of bcl-2 and bax protein in the perihematomal brain tissues. **Result:** The apoptosis and expressions of bcl-2 and bax protein were significant different in rats of experimental group compared to the rats of control group. The peak value were at the 6th, 48th hour, respectively. The expression of bcl-2 protein was negatively correlated with the number of apoptotic cells ( $r = -0.7628, P < 0.05$ ). The expression of bax protein was positively correlated with the number of apoptotic cells ( $r = 0.8438, P < 0.01$ ). **Conclusion:** Apoptosis may present and reflect brain damage after intracerebral hemorrhage. Gene bcl-2 and bax may play an important role during the period of apoptosis.

**Author's address** Dept. of Rehabilitation, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, 050000

**Key words** intracerebral hemorrhage; apoptosis; bcl-2 protein; bax protein; rat; collagenase

脑出血(intracerebral hemorrhage, ICH)是神经系统常见病和多发病,出血后继发性损害导致的组织细胞死亡具有重要意义,近期有研究认为,细胞凋亡机制参与了脑出血继发性神经细胞损伤<sup>[1-2]</sup>。本研究拟通过实验性脑出血动物模型,研究脑出血后细胞凋亡的发生、发展规律,以及 bcl-2, bax 蛋白表达对凋亡的作用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验动物与分组

实验动物用健康雄性 SD 大鼠 70 只,体重 280—300g,由河北医科大学基础医学院实验动物中心提供,以标准饲料和纯净水喂养,饲养环境为我院动物室多层层流架(河北省石家庄市长风净化设备厂,河北省实验动物研究中心监制),恒温(20—

25℃)。脑立体定位仪(江湾 I 型 C)。随机分为两组,实验组(35 只)和对照组(35 只),每组又分为术后 6h、12h、24h、48h、72h、7d、14d、7 个时相点,每个时相点 5 只。

### 1.2 材料与试剂

脑立体定位仪(江湾 I 型 C);微量注射器 5 $\mu$ l(上海安亭微量进量器厂);行为学评定用具(自制);手术器械;麻醉药速眠新 II(长春军需大学兽医研究所);VII 型胶原酶(美国 Sigma 公司),用生理盐水配制成 0.2U 胶原酶/ $\mu$ l 的溶液。鼠抗 Bcl-2 和 bax 单

1 河北医科大学第二医院康复科,河北省石家庄市和平西路 215 号,050000

2 河北省石家庄市中医院康复科

3 通讯作者:李春岩(河北医科大学第二医院神经内科,050000)

作者简介:李红玲,女,主任医师,硕士研究生导师,博士

收稿日期:2006-06-22

克隆抗体(北京中杉试剂公司);TUNEL试剂(美国Sigma公司)。

### 1.3 动物模型建立与标本采集

参照 Rosenberg 方法<sup>[3]</sup>,实验组采用 0.5U 胶原酶/2.5μl 生理盐水诱导大鼠(尾状核位置)脑出血模型,对照组为假手术组,操作方法同实验组,但不注射胶原酶,只注射同等剂量的生理盐水。然后于不同时间点摘眼球处死动物,取出大脑,去除额极 2mm 前部脑组织,经脑表面穿刺点冠状切开标本,以穿刺点为中心,取厚约 4mm 的脑组织,放入 4%多聚甲醛液固定,经脱水、透明、石蜡包埋,备用。

### 1.4 bcl-2、bax 蛋白及细胞凋亡检测

bcl-2 和 bax 蛋白检测采用免疫组化 SP 法,细胞凋亡采用 TUNEL 法。具体操作按试剂盒说明书进行,其中鼠抗 bcl-2 和 bax 单克隆抗体,工作浓度 1:100。Bcl-2 和 bax 蛋白以细胞胞浆呈棕黄色着色为阳性细胞。凋亡细胞以细胞核呈棕黄色着色为阳性细胞。随机选择 5 个视野,然后算出每高倍(400×)镜下阳性细胞数。

### 1.5 统计学分析

采用 State 统计软件进行分析。检测数据用均

数±标准差表示,TUNEL、bcl-2 及 bax 阳性细胞数两两比较采用单因素方差分析,bcl-2 及 bax 蛋白表达与细胞凋亡的关系采用直线相关分析。

## 2 结果

### 2.1 脑出血后血肿周边组织细胞凋亡,bcl-2 及 bax 蛋白表达

对照组各视野偶见 TUNEL 阳性细胞和散在的 bcl-2 及 bax 蛋白表达。实验组,6h 血肿周边 TUNEL 阳性细胞开始表达,第 24h 明显增多,第 48h 达高峰,第 72h 后逐渐降低,14d 时仍可见凋亡细胞。Bax 蛋白于 ICH 后第 6h 开始表达,第 48h 达高峰,之后逐渐下降,出血后第 14d 仍高于对照组。bcl-2 蛋白,ICH 后第 6h 表达明显,之后逐渐下降,第 48h 降至最低,第 72h 后又有回升趋势。见表 1,图 1—3(见前置彩色插页 8)。

### 2.2 bcl-2 及 bax 蛋白表达与细胞凋亡的关系

bcl-2 蛋白表达与凋亡阳性细胞呈负相关 ( $r=-0.7628, P<0.05$ ),bax 蛋白表达与凋亡阳性细胞呈正相关( $r=0.8438, P<0.01$ )。

表 1 ICH 后血肿周边组织不同时间点 TUNEL 阳性细胞、bcl-2 及 bax 蛋白表达

	6h	12h	24h	48h	72h	7d	14d
<b>TUNEL</b>							
对照组	2.50±2.38	2.87±1.44	3.12±2.26	3.09±2.14	2.49±2.05	2.31±2.23	2.45±2.42
实验组	31.5±2.65 <sup>②</sup>	51.0±13.98 <sup>②</sup>	88.0±15.75 <sup>②</sup>	97.5±22.61 <sup>②</sup>	82±6.27 <sup>②</sup>	42.75±12.53 <sup>②</sup>	10.75±2.5
<b>bcl-2 蛋白</b>							
对照组	1.5±1.73	1.58±1.48	1.62±1.61	1.64±1.58	1.45±1.62	1.55±1.82	1.61±1.78
实验组	26.5±8.35 <sup>②</sup>	17.25±2.5 <sup>②</sup>	13.0±4.69 <sup>①</sup>	10.25±2.63 <sup>①</sup>	14.25±5.56 <sup>②</sup>	16.25±5.74 <sup>②</sup>	18.5±7.19 <sup>①</sup>
<b>bax 蛋白</b>							
对照组	2.5±2.65	2.47±2.08	3.0±2.38	3.2±2.41	2.79±2.27	2.54±2.35	2.49±2.53
实验组	9.25±6.70	19.0±5.35 <sup>②</sup>	28.75±2.63 <sup>②</sup>	55.5±45.53 <sup>②</sup>	26.75±4.35 <sup>②</sup>	19.0±3.92 <sup>②</sup>	11.75±1.71 <sup>②</sup>

与对照组比<sup>①</sup> $P<0.05$ ;<sup>②</sup> $P<0.01$

## 3 讨论

细胞凋亡又称程序性细胞死亡,是一种与细胞坏死截然不同的由基因调控的主动性非炎症性细胞死亡形式。它对机体的发育和自身稳定起重要的作用。末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记(terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick endlabeling,TUNEL)是检测细胞凋亡生化特征的一种常用方法,其特异性和敏感性都较高,尤其在细胞凋亡的早期。本实验结果显示,ICH 后 6h 血肿周边 TUNEL 阳性细胞开始表达,第 24h 明显增多,第 48h 达高峰,第 72h 后逐渐降低,第 14d 时仍可见凋亡细胞。Matsushita 等<sup>[1]</sup>采用胶原酶诱导大鼠脑出血模型,用 TUNEL 染色发现,建立模型 24h 后在血肿区及其周围检测到大量凋亡细胞,Niss 染色、神经核和胶质纤维酸性蛋白免疫细胞化学双

标记染色证实,这些凋亡细胞主要为神经元和星形胶质细胞。Xue 等<sup>[4]</sup>用自体血注入法制作大鼠脑出血模型,并对脑出血后细胞凋亡进行了较长时间的观察,结果发现,细胞凋亡在自体血注入后 4h 时出现,并可持续 4 周以上。Karwacki<sup>[5]</sup>也有类似发现。本研究结果与上述结论一致。而对照组偶见凋亡细胞,与实验组有明显差异。表明 ICH 后可导致脑组织细胞发生凋亡,而且随时间变化凋亡水平也发生改变,以 ICH 后 2—3d 凋亡较明显,持续时间长达 14d。诱导脑出血后细胞凋亡的因素可能与血肿周围继发性缺血、凝血酶释放、血红蛋白分解、补体激活、炎症细胞浸润、多种因子的表达等因素有关<sup>[6]</sup>。

bcl-2 基因是从滤泡性淋巴细胞中分离出来的一种癌基因,在正常细胞的激发和发育过程中表达,而在成熟的或走向凋亡的细胞中不表达或低表达<sup>[7]</sup>。

Bcl-2 和 bax 是 bcl-2 家族中已被发现的与细胞凋亡关系密切的两种基因,在中枢神经系统均有表达。Bcl-2 基因有较弱的促进细胞周期和细胞增殖的能力,其过度表达可特异性抑制细胞凋亡,而 bax 基因的过度表达能加速依赖 IL-3 细胞株在细胞因子缺失时发生细胞凋亡,并对抗 bcl-2 对细胞凋亡的抑制作用。bax 和 bcl-2 是上述两种基因的蛋白质表达产物,bcl-2 主要通过阻止细胞凋亡的早期环节发挥作用,可阻止或降低细胞皱缩、染色质浓缩和 DNA 裂解的发生。Bax 可通过其自身形成的 bax 同二聚体和/或与 bcl-2 形成 bax-bcl-2 异二聚体而发挥作用,bax 同二聚体促进细胞凋亡,bax-bcl-2 异二聚体则抑制细胞凋亡<sup>[8]</sup>。细胞最终的结果是生存还是死亡,取决于不同基因表达的比例,如果 bcl-2 表达的水平高于 bax,那么细胞可以存活,反之则死亡。本实验结果显示,bcl-2 蛋白于 ICH 后第 6h 表达明显,之后逐渐下降,第 48h 降至最低,第 72h 后又有回升趋势。Bax 蛋白于 ICH 后第 6h 开始表达,第 48h 达高峰,之后逐渐下降。Bcl-2/bax 比值 ICH 后第 48h 最低。直线相关分析,bcl-2 表达与凋亡细胞数呈负相关,bax 表达与凋亡细胞数呈正相关,表明 bcl-2 和 Bax 参与了出血灶周围脑组织中细胞凋亡的调控。

脑出血灶周围脑组织病理组织改变十分复杂,细胞凋亡及其调控机制的研究可从分子生物学角

度,为神经细胞保护剂的研究提供途径,从而通过调控凋亡相关基因的表达,减少细胞凋亡的发生,为脑出血的治疗开辟道路。

### 参考文献

- [1] Matsushita K, Meng W, Wang X, et al. Evidence for apoptosis after intracerebral hemorrhage in rat striatum [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2000, 20:396—404.
- [2] Gong C, Boulis N, Qian J, et al. Intracerebral hemorrhage-induced neuronal death [J]. *Neurosurgery*, 2001, 48:875—883.
- [3] Rosenberg GA, Mun-Bryce BS, Wesley M, et al. Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats [J]. *Stroke*, 1990, 21 (5): 801—807.
- [4] Xue M, Del Bigio MR. Intracerebral injection of autologous whole blood in rats: time course of inflammation and death [J]. *Neurosci Lett*, 2000, 283:230—232.
- [5] Karwacki Z, Kowianski P, Dziewatkowaski J, et al. Apoptosis in the course of experimental intracerebral hemorrhage in the rat [J]. *Folia Morphol (Warsz)*, 2005, 64(4):248—152.
- [6] Chiarugi V, Maguelli L, Cinelli M. Complex interplay among apoptosis factors: RB, p53, E2F, TGF- $\beta$ , cell cycle inhibitors and the bcl-2 gene family [J]. *Pharmacol Res*, 1997, 35 (4):257.
- [7] Jaattala M. Escaping cell death: survival proteins in cancer [J]. *Exp Cell Res*, 1999, 248(1):30.
- [8] Oltvai ZN, Millman CI, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, bax, that accelerates programmed cell death [J]. *Cell*, 1993, 74:609—619.
- [9] Lichtenwalner RJ, Parent JM. Adult neurogenesis and the ischemic forebrain [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2006, 26(1): 1—20.
- [10] Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination [J]. *Stroke*, 1986, 17(3):472—476.
- [11] 刘喆, 赖新生. 大鼠中动脉闭塞脑缺血模型大鼠的建立与评价 [J]. *中国行为医学科学*, 2005, 14(10):877—878, 881.
- [12] 林文注, 王佩. *实验针灸学* [M]. 第 1 版. 上海: 上海科学技术出版社, 1994:286.
- [13] Parent JM, Vexler ZS, Gong C, et al. Rat forebrain neurogenesis and striatal neuron replacement after focal stroke [J]. *Ann Neurol*, 2002, 52(6):802—813.
- [14] Darsalia V, Heldmann U, Lindvall O, et al. Stroke-Induced neurogenesis in aged brain [J]. *Stroke*, 2005, 36(8):1790—1795.
- [15] Iwai M, Hayashi T, Zhang MR, et al. Induction of highly polysialylated neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM) in post ischemia gerbil hippocampus mainly dissociated with neural stem cell proliferation [J]. *Brain Res*, 2001, 902:288—293.
- [16] Kee NJ, Preston E, Wojtowicz JM. Enhanced neurogenesis after transient global ischemia in the dentate gyrus of the rat [J]. *Exp Brain Res*, 2001, 136(3):313—320.
- [17] Jin K, Minami M, Lan JQ, et al. Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(8):4710—4715.
- [18] Zhang RL, Zhang ZG, Zhang L, et al. Proliferation and differentiation of Progenitor cells in the cortex and the subventricular zone in the adult rat after focal cerebral ischemia [J]. *Neuroscience*, 2001, 105(1):33—41.
- [19] 刘喆, 赖新生. 电针对局灶性脑缺血大鼠神经干细胞巢蛋白表达的影响 [J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2005, 27(10):591—594.
- [20] Song H, Kempermann G, Wadiche LO, et al. New neurons in the adult mammalian brain: synaptogenesis and functional integration [J]. *J Neurosci*, 2005, 25(45):10366—10368.
- [21] 刘喆, 赖新生. 电针对局灶性脑缺血大鼠神经功能缺损及病理形态的影响 [J]. *中国针灸*, 2005, 25(12):879—884.
- [22] 刘喆, 赖新生. 论神经干细胞在缺血性脑病针灸研究中的新思路 [J]. *中国针灸*, 2004, 24 (1):69—72.

(上接 221 页)

system [J]. *Nature*, 2000, 407 (6807):963—970.