

• 基础研究 •

大鼠小肠缺血再灌注后氧自由基改变及肝脏 Bax、Bcl-2、p53 的表达

李纪鹏 王为忠 凌瑞 陈冬利 李孟彬 刘季

[摘要] 目的 探讨小肠缺血再灌注后对肝组织的损伤。方法 建立小肠缺血再灌注模型,分对照组,再灌注后 0、30 min、1 h、2 h、1 d、3 d、7 d 共 8 组,于各时点检测血中一氧化氮(NO)和超氧化物歧化酶(SOD)的浓度,用免疫组织化学 SP 法观察肝组织中 Bax、Bcl-2、p53 的表达情况。结果 大鼠小肠缺血再灌注后 NO 浓度在再灌注 0 min 升高,但至再灌注 2 h 时则明显降低,其后又持续升高,至再灌注 7 d 时达高峰。SOD 浓度在再灌注 0 min 明显下降,再灌注 2 h 时升高,随后持续下降,至再灌注 7 d 时达最低水平。再灌注 0 min,肝组织中 Bax、Bcl-2、p53 阳性细胞率增高,再灌注 30 min 时,Bax、Bcl-2、p53 阳性细胞率升高更为明显,但 Bcl-2 表达明显高于 Bax($P < 0.01$)。再灌注 2 h 时,3 种基因均有所降低,其后又开始升高,再灌注 7 d 时阳性细胞率达高峰,Bax 表达明显高于 Bcl-2($P < 0.01$)。结论 大鼠小肠缺血再灌注后引起血中 NO 和 SOD 的浓度变化及 Bax、Bcl-2、p53 阳性细胞在肝组织中的表达改变,并可能引起细胞凋亡和损伤。

[关键词] 缺血再灌注;小肠;一氧化氮;超氧化物歧化酶;Bax;Bcl-2;p53;大鼠

Change of free radical in serum and the expression of Bax, Bcl-2 and p53 in the liver after ischemia-reperfusion of small intestine LI Ji-peng, WANG Wei-zhong, LING Rui, et al. Department of Gastrointestinal Surgery, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shanxi, China

[Abstract] **Objective** To study the injuries of liver after ischemia-reperfusion of small intestine of the rat. **Methods** Models of ischemia-reperfusion of small intestine was made with rats. At 0 min, 30 min, 1 h, 2 h, 1 d, 3 d, 7 d after reperfusion, the concentration of nitric oxide(NO), superoxide dismutase (SOD) in the serum was examined and the expression of Bax, Bcl-2 and p53 in the liver was observed by the immunohistochemical SP method. **Results** The concentration of NO increased apparently 0 min after reperfusion, but decreased 2 h after, then increased gradually to a peak at 7th day. But for SOD, the concentration decreased 0 min after reperfusion, increased 2 h after, and decreased to the lowest level at 7th day. The immunohistochemical SP positive cells were observed in sinus endothelial cells and hepatocytes. The ratio of positive cells of Bax, p53 and Bcl-2 began to increase 0 minute after reperfusion and increased continuously 30 min after, while that of Bcl-2 was higher than that of Bax ($P < 0.01$). It decreased apparently 2 h after, and then increased till 7 d after reperfusion, while the ratio of Bax positive cells was higher than that of Bcl-2 ($P < 0.01$). **Conclusion** The change of concentration of NO, SOD and the expression of positive cells of Bax, Bcl-2 and p53 might play a important role in apoptosis and injuries of the liver after ischemia-reperfusion of small intestine of rat.

[Key words] ischemia and reperfusion; small intestine; nitric oxide (NO); superoxide dismutase (SOD); Bax; Bcl-2; p53; rat

中图分类号:Q344.13 文献标识码:A 文章编号:1006-9771(2005)03-0189-03

[本文著录格式] 李纪鹏,王为忠,凌瑞,等.大鼠小肠缺血再灌注后氧自由基改变及肝脏 Bax、Bcl-2、p53 的表达[J].中国康复理论与实践,2005,11(3):189-191.

小肠缺血再灌注后可引起小肠组织一系列病理生理改变,如血管内皮细胞肿胀和破坏、氧自由基的产生、微血管收缩、血小板及中性粒细胞粘附聚集、血流的降低等,其中氧自由基的改变可激活相关酶系统及凋亡相关基因,诱导细胞凋亡,造成组织细胞功能和形态上的损伤。有研究表明,小肠缺血再灌注除引起小肠组织本身损伤外,还可引起远隔脏器的次级损伤。我们通过建立大鼠小肠缺血再灌注模型,研究肝脏 Bax、Bcl-2、p53 的表达情况,探讨小肠缺血再灌注损伤后对于远隔器官的次级损害。

作者单位:710032 陕西西安市,第四军医大学西京医院普通外科。
作者简介:李纪鹏(1974-),男,河南焦作市人,博士,主治医师,主要研究方向:胃肠道疾病。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组 雄性 Wistar 大鼠 64 只,体重 200~250 g,购自第四军医大学实验动物中心。实验动物分成正常对照组、阻断肠系膜上动脉 30 min 后再灌注 0 min、30 min、1 h、2 h、1 d、3 d、7 d 共 8 组。速眠新(0.5 ml/kg)肌肉注射麻醉后,仰卧位固定于操作板上,按无菌手术操作开腹,提出小肠,于肠系膜根部分离肠系膜上动脉用 10 号丝线结扎阻断 30 min 后松开恢复血流。于开放后 0 min(动脉开放即刻)、30 min、1 h、2 h、1 d、3 d、7 d 采血备一氧化氮(NO)和超氧化物歧化酶(SOD)检测。取其肝组织以 4%多聚甲醛磷酸缓冲液(0.01 mol PBS, pH 7.4)固定以备免疫组织化学研究。

1.2 试剂 NO 和 SOD 测试盒购自南京建成生物研

究所。Bcl-2、Bax 和 p53 鼠单克隆抗体为 MBI 公司产品,链霉菌抗生物素过氧化酶免疫组化染色超敏试剂盒购自福州迈新生物技术公司,DAB 为 Sigma 公司产品。

1.3 方法

1.3.1 NO 和 SOD 的测定 NO 测定:设空白管(不加标本和亚硝酸钠)、标准管(加入亚硝酸钠 20 μmol/L)和测定管,测定管内加入 0.3 ml 待测血清。各管混匀放置 10 min,3500 r/min 离心 10 min,取上清液 0.8 ml。加入显色剂 0.4 ml 混匀,15 min 后测其吸光度值。在提前制备的标准曲线(亚硝酸钠系列溶液)查找相应 NO 浓度。

SOD 测定:按测试盒要求设测定管和对照管,测定管中加入各种反应液和待测血清混匀。37℃ 恒温水浴 40 min,加显色剂混匀,10 min 后倒入 1 cm 光径比色杯中,蒸馏水调零,用酶标仪于波长 550 nm 比色。计算 SOD 活性。对照管中不加血清样本,其他同测定管。

1.3.2 Bax、Bcl-2 和 p53 测定 组织块脱水、石蜡包埋后切片,片厚 3 μm。切片经脱蜡水化后,PBS 漂洗 10 min,依次以氧化酶阻断剂和非免疫血清室温孵育 10 min,PBS 漂洗 15 min 后,切片分别滴加 Bcl-2、Bax、p53 单克隆抗体,室温孵育 60 min,PBS 漂洗,再依次滴加生物素标记第二抗体和链霉菌抗生物素蛋白(三抗),各室温孵育 10 min,最后以 DAB 反应 5~10 min,自来水终止反应及 PBS 漂洗。以苏木精复染后,切片经酒精脱水、二甲苯透明、树胶封片光镜下观察。用 PBS 分别代替第一、二、三抗体以做阴性对照。结果判定:细胞质内出现棕黄色颗粒或匀质样棕黄色结构为 Bcl-2、Bax 免疫反应阳性细胞,p53 免疫阳性细胞细胞核呈深染棕黄色颗粒,部分细胞胞浆也有少许染色。各例切片连续观察 5 个高倍视野,计数每 100 个细胞中的阳性细胞数为阳性细胞率(以 % 表示)。

1.4 统计学分析 实验数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 13.0 中文统计软件对所得均数进行组间方差分析(F 检验)。

2 结果

大鼠小肠缺血再灌注后 NO 浓度在再灌注 0 min 明显升高,但至再灌注 2 h 时明显降低,其后又持续升高,至再灌注 7 d 时达高峰。SOD 浓度在再灌注 0 min 明显下降,再灌注 2 h 时升高,随后持续下降,至再灌注 7 d 时达最低水平。见表 1。

Bax、Bcl-2 及 p53 免疫阳性细胞主要为肝组织中血管窦内皮细胞和肝细胞,Bax、Bcl-2 免疫阳性细胞胞浆呈棕黄色颗粒或匀质状,p53 免疫阳性细胞细胞核呈深染棕黄色颗粒,部分细胞胞浆也有少许染色。再

灌注 0 min,Bax、Bcl-2 和 p53 阳性细胞率开始增多,再灌注 30 min,Bcl-2 阳性细胞率明显高于 Bax 阳性细胞率($P < 0.01$)。但至 2 h 时明显降低,其后持续升高,7 d 时阳性细胞率达到最高水平,但 Bax 阳性细胞率明显高于 Bcl-2($P < 0.01$)。见表 2。

表 1 NO 和 SOD 浓度变化

组别	NO(nU/ml)	SOD(μmol/L)
对照组	28.74 ± 1.68	121.50 ± 1.59
0 min	42.56 ± 7.24 ^a	106.15 ± 6.08 ^a
30 min	38.76 ± 4.58 ^a	113.91 ± 5.14 ^a
1 h	34.63 ± 4.08 ^a	115.96 ± 6.81 ^a
2 h	28.63 ± 1.67	120.36 ± 2.75
1 d	39.94 ± 4.4 ^a	105.14 ± 11.64 ^a
3 d	42.11 ± 3.26 ^a	103.05 ± 5.55 ^a
7 d	48.64 ± 9.7 ^a	101.26 ± 12.46 ^a

注:a:与对照组比较, $P < 0.01$ 。

表 2 肝组织中 Bax、Bcl-2 和 p53 的阳性细胞表达率(%)

组别	Bax	Bcl-2	p53
对照组	0	0	0
0 min	2.88 ± 1.24	1.06 ± 0.49 ^a	1.00 ± 0.29
30 min	11.25 ± 2.55	24.75 ± 5.12 ^b	7.12 ± 2.17
1 h	6.75 ± 2.25	14.88 ± 3.87 ^a	1.88 ± 0.58
2 h	1.19 ± 0.46	6.13 ± 2.48 ^b	0.74 ± 0.24
1 d	21.38 ± 8.25	12.25 ± 4.03 ^b	13.75 ± 3.88
3 d	34.00 ± 5.68	21.88 ± 5.94 ^b	21.63 ± 4.63
7 d	63.25 ± 9.35	41.25 ± 5.17 ^b	38.50 ± 6.68

注:与 Bax 阳性率比较,a: $P < 0.05$,b: $P < 0.01$ 。

3 讨论

小肠缺血再灌注后可引起小肠组织一系列病理生理改变,造成小肠组织功能和形态学病理性改变,如血管内皮细胞肿胀和破坏,氧自由基的损伤,微血管收缩,血小板及中性粒细胞粘附聚集,血流的降低等^[1-2],其中氧自由基的改变,可造成对膜结构的磷脂不饱和脂肪酸的攻击,引起跨膜离子梯度改变,钙离子进入细胞内,引起钙超载并激活相关酶系统及凋亡相关基因,诱导细胞凋亡,造成组织细胞功能形态上的损伤^[3-6]。

NO 是一种不稳定小分子,结构简单的自由基。在小肠缺血再灌注后早期,NO 及 NO 产物可通过抑制血小板和白细胞的黏附和聚集,中和超氧自由基,扩张血管等作用保护小肠,同时在小肠缺血再灌注引起的内毒素损伤过程中通过维持血管的完整性而起到对小肠的保护作用^[7-11]。在本实验中,小肠缺血再灌注早期血流恢复过程中,NO 合成增加;随后由于分解作用,与氧自由基的结合而持续降至最低,但是随着小肠缺血再灌注时间的延长,NO 的合成逐渐增加。有研

究显示, NO 的过量生成将会对组织细胞起到损伤作用^[12]。NO 参与中性粒细胞、淋巴细胞和巨噬细胞的毒性作用, 同时与 O_2^- 结合生成过氧亚硝基, 直接或通过分解成许多小分子毒性物质损伤细胞。NO 通过这些毒性作用可直接损伤细胞的 DNA 或作用于细胞的凋亡信号通路或协同其他细胞因子诱导细胞凋亡^[13]; 在凋亡细胞中, 一氧化氮合酶 mRNA 表达明显增强, 说明 NO 能够诱导凋亡^[14-15]。

小肠缺血再灌注后 0 min, SOD 由于清除氧自由基消耗而出现下降, 随着血流的恢复合成增加; 但随着再灌注时间的延长, 氧自由基的增加, SOD 由于清除作用消耗而再次持续降低。

有研究表明, 小肠缺血再灌注后除对小肠组织本身损害外, 还会对远隔器官造成次级损害^[16]。Bax 是重要的异二聚体伴分子, 与 Bcl-2 共存于线粒体, Bax 可与 Bcl-2 构成异二聚体, 而 Bax 自身也可组成同二聚体诱导凋亡。Bcl-2 必须结合 Bax 才能发挥其作用, Bcl-2 的过度表达与 Bax 形成异二聚体而阻抑凋亡^[17-18], p53 是 Bax 和 Bcl-2 基因的调节物, 其基因产物 p53 蛋白是一个转录激活蛋白, 可引起细胞周期阻滞, 诱导凋亡促进分化^[19]。在本实验中, 小肠缺血再灌注后 30 min, 肝组织中 Bax、Bcl-2、p53 表达较正常明显增加, 存活基因 Bcl-2 的表达明显高于 Bax; 但随着再灌注时间的延长, Bax 和 p53 的表达增强。有研究显示, p53 能从转录水平下调 Bcl-2 的表达, 所以虽然 Bcl-2 表达也增加, 但 Bax 的表达明显高于 Bcl-2。提示肝组织细胞内凋亡相关基因明显被激活, 将可能引起组织损伤。

我们的研究提示, 小肠缺血再灌注后包括氧自由基等因素不仅损伤小肠组织本身, 还可能对肝组织造成严重的次级损害。这是否与手术创伤、器官移植等原因造成的缺血再灌注后的多器官功能衰竭及并发症有关还需进一步探讨。

[参考文献]

- [1] Koo A, Komatsu H, Tau G, et al. Contribution of no-reflow phenomenon to hepatic injury after ischemia-reperfusion: evidence for a role of superoxide anion[J]. *Hepatology*, 1992, 15(3): 507 - 514.
- [2] Fabian MA, Canada AT, Coleman LR, et al. Use of tissue blood flow and high energy content to predict small bowel graft survival[J]. *Transplant Proc*, 1992, 24(3): 1088 - 1098.
- [3] Bastide M, Bordet R, Pu Q, et al. Relationship between inward rectifier potassium current impairment and brain injury after cerebral ischemia/reperfusion[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1999, 19(12): 1309 - 1315.
- [4] Mitsuoka H, Unno N, Sakurai T, et al. Pathophysiological role of

- endothelins in pulmonary microcirculatory disorders due to intestinal ischemia and reperfusion[J]. *J Surg Res*, 1999, 87(2): 143 - 151.
- [5] Park JL, Lucchesia BR. Mechanisms of myocardial reperfusion injury[J]. *Ann Thorac Surg*, 1999, 68(5): 1905 - 1912.
- [6] Yoshidome H, Kato A, Edwards MJ, et al. Interleukin-10 inhibits pulmonary NF- κ B activation and liver injury induced by hepatic ischemia-reperfusion[J]. *Am J Physiol*, 1999, 277 (5 pt 1): L919 - 923.
- [7] Aoki N, Johnson G, Lefer AM. Beneficial effects of two forms of NO administration in feline splanchnic artery occlusion shock[J]. *Am J Physiol*, 1990, 258(2 pt 1): G275 - 286.
- [8] Hutcheson JR, Whittle BJR, Boughton-Smith NK. Role of nitric oxide in maintaining vascular integrity in endotoxin-induced acute intestinal damage in the rat[J]. *Br J Pharmacol*, 1990, 101(4): 815 - 822.
- [9] Wright CE, Rees DD, Mocada S. Protective and pathological roles of nitric oxide in endotoxin shock[J]. *Cardiovasc Res*, 1992, 26(4): 48 - 69.
- [10] Andrews FJ. Protection against gastric ischemia-reperfusion injury by nitric oxide generator[J]. *Dig Dis Sci*, 1994, 39(2): 366 - 372.
- [11] Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide, an endogenous modulator of leukocyte adhesion[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(11): 4651 - 4661.
- [12] Zingarelli B, Squadrito F, Altavilla D, et al. Evidence for a role of nitric oxide in hypovolemic hemorrhagic shock[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1992, 19(6): 982 - 988.
- [13] Fehsel K, Kroncke KD, Meyer KL, et al. Nitric oxide induces apoptosis in mouse thymocytes[J]. *J Immunol*, 1995, 155(6): 2858 - 2862.
- [14] Wildhirt SM, Dudek RR, Suzuki H, et al. Immunohistochemistry in the identification of nitric oxide synthase isoenzymes in myocardial infarction[J]. *Cardiovasc Res*, 1995, 29(4): 526 - 534.
- [15] Cai B, Roy DK, Sciacca R, et al. Effects of immunosuppressive therapy on expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) during cardiac allograft rejection[J]. *Int J Cardiol*, 1995, 50(3): 243 - 250.
- [16] Koksoy C, Ergun H, Domirpence E, et al. Intestinal ischemia and reperfusion impairs vasomotor functions of pulmonary vascular bed[J]. *Ann Surg*, 2000, 231(1): 105 - 111.
- [17] Yan RL, Wang JB, Hui HX, et al. Expression and significance of proapoptosis gene bax in epithelial ovarian tumour[J]. *Dr Si Junyi Daxue Xuebao*, 1998, 19(3): 322 - 324.
- [18] Tang QH, Wang H, Chen BQ, Cong YP, et al. Expression and significance of anti-apoptotic gene bcl-2 in renal cell carcinoma[J]. *Dr Si Junyi Daxue Xuebao*, 1999, 20(2): 141 - 145.
- [19] Formigli L, Ibba Manneschi L, Perna AM, et al. Ischemia-reperfusion-induced apoptosis and p53 expression in the course of rat heterotopic heart transplantation[J]. *Microvasc Res*, 1998, 56(3): 277 - 281.

(收稿日期: 2004-09-28 修回日期: 2005-01-07)