

马钱子碱中毒肾小管上皮细胞 Bcl₂和 CasPase3表达的观察

Bcl₂ and CasPase3 expression in renal tubular epithelial cells exposed to brucine

雷怀成¹, 曾梅斌², 刘涛^{3*}

LEI Huai-cheng¹, ZENG Mei-bin², LIU Tao^{3*}

(1. 郟阳医学院法医学教研室, 湖北 十堰 442000 2. 十堰市公安局法医室, 湖北 十堰 442000 3. 郟阳医学院附属太和医院病理科, 湖北 十堰 442000)

摘要: 以 60 只 Wistar 大鼠制作马钱子中毒模型, 应用免疫组织化学方法研究大鼠肾小管上皮细胞中毒后 Bcl₂ 与 CasPase3 蛋白表达的变化规律。大鼠在中毒后肾小管上皮细胞 Bcl₂ 与 CasPase3 蛋白阳性表达数均高于正常对照组, Bcl₂ 与 CasPase3 在 1 d 后出现表达, 2~3 d 达高峰, 5 d 和 7 d 两种蛋白表达逐渐下降。提示 Bcl₂ 与 CasPase3 参与了马钱子中毒的病理生理过程。

关键词: 马钱子碱; 中毒; Bcl₂ 蛋白; CasPase3 蛋白; 肾小管; 上皮细胞

中图分类号: R595.3 文献标识码: B

文章编号: 1002-221X(2008)06-0378-02

马钱子能散结消肿、通络止痛, 主治风湿顽痹、麻木瘫痪、跌打损伤、痈疽肿痛等。马钱子中毒除出现全身阵发性强直痉挛等中枢神经系统症状外, 还可以通过兴奋延髓的血管运动中枢, 使血管平滑肌张力增高, 小动脉收缩, 血压上升, 导致肾小管上皮细胞因缺血、缺氧而发生坏死^[1]。有关马钱子中毒的机制和病理变化还未完全阐明, 本实验采用免疫组织化学染色方法对马钱子中毒后的肾脏进行 Bcl₂ 及 CasPase3 蛋白表达变化规律的检测, 为病理和毒理学提供形态学参数。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

Wistar 大鼠 60 只 (郟阳医学院实验动物中心提供), 雌、雄各半, 体重 (200±10) g 随机分为对照组 (10 只) 和染毒组 (50 只), 大鼠喂养 1 周后, 染毒组按文献^[2] 予马钱子碱 233 mg/kg 一次性灌胃给药, 对照组用等量无离子水灌胃, 正常饮食。之后的 6 h 内精神萎靡, 仅进食水, 12 h 后逐渐恢复活动, 正常进食。

1.2 主要试剂

兔抗鼠 Bcl₂ 多克隆抗体及兔抗鼠 CasPase3 多克隆抗体, 由北京中杉生物技术有限公司提供; 马钱子碱由十堰市药品检定所提供。

1.3 标本处理

染毒组分别在染毒后 1、2、3、5、7 d 每次颈椎脱臼处死 10 只。对照组分别在相应时间每次处死 2 只。取出双侧肾

脏, 冠状位切开, 用 10% 的甲醛固定。相邻石蜡切片 1/2 做常规 HE 染色, 另 1/2 做 SP 免疫组织化学染色。用 Leica Q500 W 图像分析仪, 将每张免疫组化染色呈阳性反应的细胞切片在显微镜 (×200) 下随机选择 10 个视野, 测量单位面积内肾小管上皮细胞呈阳性反应的细胞数 (个/mm²)。结果用 SPSS10.0 软件进行统计分析, 以 P<0.05 作为有统计学意义检验标准。

2 结果

2.1 HE 染色结果

经 HE 染色, 光学显微镜下观察可见染毒组大鼠肾脏淤血, 部分肾小管上皮细胞水肿及脂肪变性。对照组未见肾小管上皮细胞病理变化。

2.2 免疫组化染色结果

2.2.1 Bcl₂ 免疫组化染色 形态学观察, 对照组 2 例见有少数阳性细胞, 其余均为正常形态的肾小管上皮细胞。染毒组细胞胞浆中均可见明显棕黄色; 染毒 1 d 组的肾小管上皮细胞中, 阳性细胞明显多于其他染毒组。染毒 2~3 d 阳性细胞达到一定峰值, 染毒 5 d 组阳性细胞逐渐减少, 至染毒后 7 d 仍然可见少量的阳性细胞。

2.2.2 CasPase3 免疫组化染色 在染毒后的不同时间段内肾小管上皮细胞中 CasPase3 阳性细胞数均显著高于对照组, 差异有统计学意义 (P<0.05)。染毒后 1 d 阳性细胞数明显增加, 即达到峰值, 细胞胞浆核中可见明显棕黄色。2~3 d 后维持一定峰值, 第 5 天、第 7 天阳性细胞亦呈下降趋势。详见表 1

3 讨论

原癌基因 Bcl₂ 是研究最早的一种重要的抑制凋亡的基因, Bcl₂ 存在于线粒体外膜、核膜、内质网上, 它通过阻断细胞死亡传递系统的最后共同通道而抑制程序性细胞死亡, 从而促进细胞存活。Bcl₂ 的表达对正常细胞的自身稳定性起重要作用^[3,4]。本实验研究结果显示, 马钱子中毒后, 肾小管上皮细胞表达 Bcl₂ 说明马钱子中毒后肾脏代谢时损伤了肾小管上皮细胞。Bcl₂ 表达在中毒后 1 d 明显上升, 2~3 d 内达高峰, 维持一定峰值后逐渐降低, 但在中毒 7 d 后, 其表达依然显著高于正常。Bcl₂ 在马钱子中毒后的表达均有明显的时序性、规律性, 表明 Bcl₂ 表达起到保护细胞免于凋亡的作用。中毒发生后, 凋亡抑制基因启动较快, 但持续时间短; 促凋亡基因的表达虽然启动较缓慢, 但启动后逐渐上升, 并在一段较长的时间保持较高水平的表达^[5-8]。

收稿日期: 2008-07-02 修回日期: 2008-08-27

作者简介: 雷怀成 (1954-), 男, 教授, 主要从事法医学病理学及毒物学研究。

* 通讯作者, 主管技师。

表 1 马钱子染毒后不同时间肾小管上皮细胞两种蛋白表达阳性细胞数 (X±S)

个/mm²

组别	Bcl2蛋白阳性细胞数					Caspase3阳性细胞数				
	1 d	2 d	3 d	5 d	7 d	1 d	2 d	3 d	5 d	7 d
染毒组	226±28.7*	210.6±24.26*	195.6±20.28*	162.3±16.12	102±10.12	286±27.6*	279±26.28*	268.6±22.22	214.3±15.18*	156±12.26
对照组	2.26±0.18	1.67±0.16	1.07±0.13	0.70±0.06	0.30±0.02	1.76±0.12	1.56±0.14	0.70±0.06	0.40±0.03	0.20±0.02

与对照组比较 * P<0.05

细胞色素 C和 ATP是激活细胞凋亡蛋白酶活化因子 (Apaf1) 的辅助因子。活化的 Apaf1、细胞色素 C和 pro-caspase-9形成凋亡聚体, 导致 CasPase-3级联效应执行凋亡过程。Caspase-3是细胞凋亡的关键执行者, 在各种原因导致的细胞凋亡过程中, CasPase-3的作用必不可少^[9-10]。但也有研究表明, 外界刺激下 CasPase-3的广泛表达, 并未导致细胞凋亡, 相反增强了细胞抗刺激能力, 对机体及细胞具有保护作用^[10]。实验中发现, CasPase-3的表达在中毒后 1 d明显上升, 2~3 d内达峰值, 随着时间延长逐渐降低。笔者认为, 大鼠在马钱子中毒后肾小管上皮细胞 CasPase-3的表达在中毒初期对细胞可能起保护作用, 当这种保护作用不足以代偿或修复时即启动凋亡程序, 诱导细胞凋亡, 说明马钱子碱在体内代谢过程中造成细胞损伤及凋亡。

本研究表明, 中毒组大鼠的肾小管上皮细胞 Bcl2与 CasPase-3的表达几乎同时出现, 这说明机体剧烈应激时, 会迅速启动各种保护机制, Bcl2和 CasPase-3将参与这种保护过程。但 Bcl2的峰值明显早于 CasPase-3的表达, 而 Bcl2又是 CasPase-3的底物, Bcl2蛋白的环区被 CasPase-3在 Asp34处剪切降解, 进而导致细胞凋亡^[11]。关于 Bcl2与 CasPase-3蛋白表达在中毒肾脏的病理变化有待进一步研究探讨。

参考文献:

[1] 黄光照, 汪德文. 法医毒理学 [M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2004 129-130.
 [2] 王琦伟, 刘良, 黄光照. 马钱子的毒理学研究进展 [J]. 法医学

杂志, 2004 20 (3): 183-184
 [3] 梅增辉, 姚芳, 邓伟年, 等. 视神经横断伤后视网膜形态学改变及 Bcl2/Bax表达 [J]. 法医学杂志, 2007 23 (3): 170-173
 [4] Olivai Z N, Millin C, I Kovsmyer S J. Bcl2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog Bax that accelerates programmed cell death [J]. Cell 1993 74 609-619
 [5] 朱旭阳, 汪枫, 方维华, 等. 实验性大鼠脑震荡后 Bcl2的表达 [J]. 法医学杂志, 2007 23 (1): 18-19
 [6] Vinet J, Benier P J, Andre' Parent. Bcl2 expression in thalamus, brainstem, cerebellum and visual cortex of adult primate [J]. Neuro science Research 2002 42: 269-277.
 [7] Bomer C. The Bcl2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions [J]. Molecular Immunology 2003 39 (5): 615-647
 [8] Hishikawa K, Nakaki T, Fujii T. Connective tissue growth factor induces apoptosis via CasPase-3 in cultured human aortic smooth muscle cell [J]. Eur J Pharmacol 2000 392 (1): 19-22
 [9] McLoughlin B, Harnett K A, Erhardt J A, et al. CasPase-3 activation is essential for neuroprotection in preconditioning [J]. Proc Natl Acad Sci USA 2003 100 (2).
 [10] Buckley C D, Pilling D, Henriquez N V, et al. Christopher D. RGD peptides induces apoptosis by direct CasPase-3 activation [J]. Nature 1999 397 (6719): 534-539
 [11] 王晔, 谌利华, 陈维杰, 等. 大鼠毒鼠强中毒内脏器官 CasPase-3与 Bcl2蛋白的表达 [J]. 法医学杂志, 2006 22 (4): 241-244

(上接第 376页)

[5] Eyer F, Meischnr V, Kiderlen D, et al. Human para thion poisoning: A toxicokinetic analysis [J]. Toxicol Rev 2003 22 (3): 143-163.
 [6] Eigenberg D A, Pazdemik T L, Doull J, et al. Hemoperfusion and pharmacokinetic studies with para thion and paraoxon in the rat and dog [J]. Drug Metab Dispos 1983 11 (4): 366-370.
 [7] Pena-Egido M, J Marino-Hernandez E L. Toxicokinetics of para thion in the rabbit [J]. Arch Toxicol 1988 61 (3): 196-200
 [8] Hoffmann U, Papendorf T. Organophosphate poisonings with para thion and diethoatp [J]. Intensive Care Med 2006 32 (3): 464-468
 [9] Mourix J, De Jong LPA. Binding of the organophosphates para thion and paraoxon to bovine and human serum albumin [J]. Arch Toxicol 1978 41 (1): 43-48
 [10] Neal R A, Poore R E. Evidence for extrahepatic metabolism of para thion [J]. Toxicol Appl Pharmacol 1972 23 (4): 759-768
 [11] Butler A M, Murray M. Inhibition and inactivation of constitutive cytochromes P450 in rat liver by para thion [J]. Mol Pharmacol

1993 43 (6): 902-908
 [12] Mutch E, Williams F M. Diazinon, chlorpyrifos and para thion are metabolized by multiple cytochromes P450 in human liver [J]. Toxicology 2006 224 (1-2): 22-32
 [13] Elaine M, Daly A K. Multiple cytochrome P450 isoforms contribute to para thion metabolism in man [J]. Arch Toxicol 2003 77 313-320
 [14] Viarjos J A, Sultatos L G. Kinetic mechanism of the detoxification of the organophosphate paraoxon by human serum A-esterase [J]. Drug Metab and Dispos 1994 22 (3): 472-478.
 [15] Lessire F, Gustin P, De Jaunois A. Relationship between para thion and paraoxon toxicokinetics, lung metabolic activity and cholinesterase inhibition in guinea pig and rabbit lungs [J]. Toxicol Appl Pharmacol 1996 138 (2): 201-210
 [16] Norman B J, Neal R A. Examination of the metabolism in vitro of para thion (diethyl p-nitrophenyl phosphorothionate) by rat lung and brain [J]. Biochem Pharmacol 1976 25 (1): 37-45