

· 临床研究 ·

胆红素对 L-02 细胞凋亡以及 Bcl-2 及 Bax 体外表达影响的研究

陈兆夷¹, 陈兆武², 王光明¹, 邓衍部¹, 刘有理¹, 黄志刚¹

(1. 安徽省宣城市人民医院消化内科 242000; 2. 安徽医科大学基因重点实验室, 合肥 230022)

摘要:目的 探讨胆红素对健康人肝细胞系 L-02 凋亡的影响及 Bcl-2、Bax 基因对凋亡过程的调节。方法 将不同浓度的胆红素(终浓度分别为 0、100、150、200、250、300 mg/L)作用于体外培养的健康人肝细胞 L-02, 采用流式细胞仪和碘化丙啶(PI)双标等技术观察细胞的凋亡率和免疫组织化学方法检测细胞凋亡状态及凋亡相关基因 Bcl-2、Bax 蛋白的表达。结果 Bcl-2 蛋白的表达, 对照组为阴性表达, 低浓度组弱阳性表达, 高浓度组强阳性表达。Bax 蛋白的表达, 对照组可见表达, 低浓度组表达增多, 高浓度组明显增多, 强阳性表达。表明 Bcl-2 蛋白表达越强, 凋亡指数越少; Bax 蛋白表达越强, 凋亡指数越强。结论 Bcl-2、Bax 蛋白均参与了胆红素所诱导的 L-02 细胞凋亡的调节, 并在细胞凋亡的发生、发展中起重要作用。

关键词:胆红素; 细胞凋亡; L-02 细胞系; Bcl-2; Bax

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.35.010

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)35-3713-02

A research of the influence of bilirubin on the apoptosis of L-02 cell line and the expression of Bcl-2 and Bax

Chen Zhaoyi¹, Chen Zhaowu², Wang Guangming¹, Deng Yanbu¹, Liu Youli, Huang Zhigang¹

(1. Department of Gastroenterology and Hepatology, The People's Hospital of Xuancheng City, Xuancheng,

Anhui 242000, China; 2. Department of Laboratory Medicine, Anhui Medical University, Hefei, Anhui 230032, China)

Abstract: **Objective** To investigate the influence of bilirubin on the apoptosis of L-02 cell line in healthy human liver, and investigate the regulation of Bcl-2 and Bax on the apoptosis process. **Methods** The L-02 cells cultured in vitro and treated with bilirubin with the concentration 0, 100, 150, 200, 250, 300 mg/L respectively. The growth and apoptosis of L-02 cell was assessed by flow cytometry Annexin V and PI; the expression of gene Bcl-2 and Bax were detected by immunohistochemistry. **Results** Immunohistochemistry showed a negative expression of Bcl-2 in the control group, a weak positive expression in the low concentration group and a strong positive expression in the high concentration group; and a visible expression of Bax in the control group, an increased expression in the low concentration group and a significantly increased strong positive expression in the high concentration group. This indicates that the expression of Bcl-2 has a negative correlation with apoptotic rate nevertheless the Bax expression has a positive correlation. **Conclusion** Bcl-2 and Bax could regulate the apoptosis of L-02 cell line induced by bilirubin and play an important role in the occurrence and development of cell apoptosis.

Key words: bilirubin; apoptosis; L-02 cells; Bcl-2; Bax

笔者在前期研究中证明, 高胆红素作用可导致 L-02 细胞先发生凋亡, 随后部分凋亡细胞发生继发性坏死, 其程度与胆红素浓度呈显著正相关^[1]。关于胆红素对 L-02 细胞凋亡的机制及 Bcl-2 与 Bax 表达在其过程中的意义, 笔者进行了后续研究, 现将结果报道如下。

1 材料与方

1.1 主要试剂 胆红素、DMEM 培养基为美国 Gibco 公司产品; 小牛血清为杭州四季青生物制品有限公司产品。

1.2 主要仪器 采用倒置荧光显微镜(德国 LEICA 公司), FACSCalibur 型流式细胞检测仪(美国 BD 公司)。

1.3 方法

1.3.1 胆红素标准液的配制^[2] 精确称取胆红素 20 mg, 溶于稀释血清 80 mL(其中血清和生理盐水的比例是 1:24), 加 4 mL 二甲亚砜(DMSO)和 2 mL 碳酸钠(Na₂CO₃)(0.1 mol)制成浓度为 200 mg/L(342 μmol/L)的胆红素溶液。每次实验前胆红素溶液均新鲜配制, 所有实验步骤均在弱光下进行, 以防止胆红素转变为其他同分异构体。

1.3.2 细胞培养 健康人肝细胞系 L-02 细胞购于南方医科大学, L-02 细胞接种于体积分数 15% 胎牛血清、青霉素各 100 U/mL 和谷氨酰胺 2 mol/L 的 DMEM 培养液中, 置 37℃、5% CO₂、95% 湿度条件下的培养箱中培养, 平均每 2~3 天换液、传代 1 次, 实验时使用指数生长期细胞。

1.3.3 流式细胞术检测细胞凋亡率 应用不同浓度胆红素溶液作用 12 h 后收集各组细胞(1×10⁶/mL), 0.25% 胰酶 37℃ 消化细胞, 至缩呈圆形, 收集细胞入离心管离心(1 000 r/min, 10 min), 弃上清液, 冰冷磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 2 次, 200 μL 结合缓冲液轻轻重悬细胞。加入 10 μL Annexin-V 异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC), 4℃ 避光孵育 30 min。加入 300 μL 结合缓冲液和 5 μL 浓度为 20 μg/mL 的碘化丙啶(propidium iodide, PI)轻轻混匀, 立即上机检测。检测在安徽省立医院中心实验室完成。

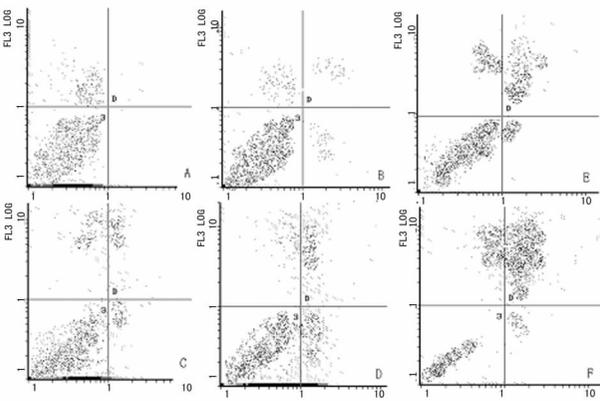
1.3.4 胆红素对人肝细胞 L-02 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响 将 L-02 细胞(1×10⁶/mL)接种于 6 孔板中进行细胞爬片, 细胞贴壁后应用不同浓度胆红素溶液作用 24 h(终浓度分别为 0、100、150、200、250、300 mg/L); 弃上清液后用 PBS 洗 2 次并用多聚赖氨酸固定玻片; 每张片加 1 滴过氧化氢酶阻断溶液(试剂 A), 室温下孵育 20 min, 以阻断内源性过氧化物酶的活性。PBS 冲洗 4 min 3 次。去除 PBS, 滴加动物血清(试剂 B)封闭, 室温下孵育 20 min, 清除非特异性吸附, 以降低非特异性背景着色。擦去多余血清, 滴加一抗 Bcl-2(工作液), 室温下孵育 3~4 h, PBS 冲洗 4 min 3 次。滴加生物素化二抗工作液(试剂 C), 室温下孵育 20 min, PBS 冲洗 4 min 3 次。去除 PBS, 滴加链霉菌抗生物素蛋白一过氧化酶(试剂 D), 室温下孵育 20 min, PBS 冲洗 4 min 3 次。去除 PBS, 滴加 DAB 显色液染色 3

min。水洗终止,苏木素染色,自来水冲洗返蓝。脱水干燥,透明,封片,光镜下观察,照相。判断标准:按染色强度评分:0分为无色,1分为浅黄色,2分为棕黄色,3分为棕褐色,染色强度需与背景色相对比。

1.4 统计学处理 采用 PEMS3.1 for Windows 统计软件进行分析,经方差齐性检验,各组方差齐,采用方差分析,组间两两比较采用 q 检验;各组方差不齐,采用秩和检验;判断两数值变量间有无直线相关关系,及其相关方向和程度,采用相关分析法检验,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胆红素诱导 L-02 细胞凋亡率变化 经流式细胞仪检测,凋亡的 L-02 细胞分布在左上区,而正常细胞为 FITC 和 PI 均低染,分布在流式细胞分析图的左下区。早期凋亡细胞以 Annexin V-FITC 染色为主,在流式细胞分析图的右下区,晚期凋亡细胞则 Annexin V-FITC 和 PI 双染色,位于流式细胞分析图的右上区。本研究结果表明,胆红素能诱导 L-02 细胞凋亡,细胞凋亡率与胆红素浓度呈浓度-效应关系(图 1)。相关分析表明,细胞坏死数量与胆红素浓度之间无明显相关($r=0.5156$, $P=0.2952$),但细胞凋亡数量与胆红素浓度之间呈显著相关($r=0.8852$, $P=0.0190$)。



A:空白对照组;B、C、D、E、F:100、150、200、250、300 mg/L 胆红素溶液组。

图 1 流式细胞仪检测不同浓度胆红素作用 L-02 细胞 12 h 后的凋亡的变化

2.2 免疫组织化学法检测 Bcl-2、Bax 蛋白的表达 Bcl-2 在 300 mg/L 组偶见棕黄色颗粒状,呈散在、弱阳性表达,200 mg/L 组与 300 mg/L 组相比较阳性细胞数增多,染色加深,呈黄褐色表达,见封 3 图 2~4。

Bax 主要在肝细胞胞浆呈棕黄色颗粒状;0 mg/L 组未见阳性表达,200 mg/L 组可见肝细胞散在、弱阳性表达,较 150 mg/L 组有所增强,阳性细胞数增多,250 mg/L 组阳性染色进一步加深,阳性细胞多,300 mg/L 组肝细胞弥漫阳性染色,染色加深,阳性细胞数增多,见封 3 图 5~7。

3 讨论

细胞凋亡是细胞有序而协调激活凋亡刺激基因和凋亡抑制基因共同控制的过程^[3]。在线粒体调控细胞凋亡的体系中,Bcl-2、Bax 是线粒体膜蛋白中最重要的代表。Bcl-2、Bax 比例失调可能是肝细胞凋亡增加的原因之一^[4]。Bcl-2 基因是目前最受关注的与细胞凋亡相关的基因之一。Bcl-2 基因蛋白表达产物定位于线粒体膜、核膜和内质网,任其氨基酸 C-末端由 19 个氨基酸残基组成的疏水性片段,并借此与膜相连。通过转基因动物和基因转染实验研究发现,Bcl-2 对细胞凋亡具有明显

的抑制作用^[5]。目前,已发现多种与 Bcl-2 同源的基因,如 Bcl-xl、Bcl-xs、Bax 基因等^[6]。这些基因构成了 Bcl 基因家族,在体内 Bcl-2 基因家族的成员可以具有两种截然不同的功能,Bax 基因是近年来新发现的一种凋亡促进基因,属 Bcl-2 同一家族。Bcl-2 保护线粒体的完整性,抑制细胞色素 C 的释放,而 Bax 在线粒体膜上形成多聚体影响其完整性,使线粒体释放 Caspase 活化因子(如细胞色素 C 等)并进入胞浆中,诱发 Caspase 家族表达引起的细胞凋亡^[7]。Bax 蛋白的氨基酸序列有 21% 与 Bcl-2 同源,有 3 种不同的编码蛋白 Bax- α 、Bax- β 及 Bax- γ 。Bax 基因具有拮抗 Bcl-2 抑制凋亡的作用。Bcl-2 及 Bax 蛋白都是均一的二聚体,反应时需一个分子 Bcl-2 及一个分子 Bax 结合,形成异二聚体,结合后的蛋白才具有调节功能^[8]。Bax/Bcl-2 的比值,对于决定细胞接受刺激信号后存活与否起关键作用。Bcl-2 过量表达(Bcl-2-Bcl-2),细胞存活;Bax 过量表达(Bax-Bax)细胞死亡。

本研究证实,在高浓度胆红素时 Bcl-2 不表达或少量表达,肝组织出现细胞凋亡明显增加;在低浓度胆红素时,Bcl-2 大量表达,出现肝组织细胞凋亡明显减少而表明,Bcl-2 的表达起到了抑制肝细胞凋亡的作用。Bax 明显高表达时,体外胆红素作用 L-02 细胞凋亡明显增多,同时,Bcl-2 蛋白表达越强,凋亡指数就越少;Bax 蛋白越强,凋亡指数就越高。表明 Bcl-2 和 Bax 蛋白均参与了体外胆红素作用于 L-02 细胞凋亡的调节,Bcl-2 起抑制凋亡的作用,Bax 起促进凋亡的作用,他们在高胆红素时所导致肝损害的发生、发展中起着重要作用。

本研究应用凋亡定性(DNA 片段、Hoechst33258 荧光染色)分析获取凋亡的直接证据和定量(流式细胞仪)对细胞凋亡进行观察;也分别从凋亡的早期(PI-Annexin V 双染色法)和晚期(DNA 片段)检测;免疫组化法进一步检测胆红素处理肝细胞 24 h 后 Bcl-2 与 Bax 的表达水平的变化。综合分析结果,为高胆红素血症可以诱导健康人肝细胞的凋亡,并呈良好的剂量-效应关系。这种现在也许就可以用高胆红素血症诱导肝细胞凋亡,部分的解释“胆酶分离”现象高死亡率的原因。与以往对于肝脏衰竭的发生是肝细胞的急性大量死亡不能为细胞增生所补偿的结果的认识有所改变。本研究结果提示,高胆红素血症的时候,凋亡是肝细胞的第一反应,而坏死则往往出现于细胞凋亡之后,肝细胞的凋亡过程对随之出现的肝细胞坏死的行程起着至关重要的作用。也许可以试着从抑制细胞凋亡这个源头来治疗肝衰竭。在胆红素到达一定水平时,给予积极的预防凋亡等治疗以防止肝细胞进一步坏死。通过对 Bcl-2、Bax 基因的进一步深入研究,有望为探讨胆红素诱导 L-02 细胞凋亡的发生机制以及在高胆红素血症所指肝损害发生、发展中所起的作用提供理论依据。

参考文献:

- [1] 陈兆夷,陈兆武,李胜联,等.体外胆红素对 L-02 细胞生长与凋亡的影响[J].第三军医大学学报,2010,24(32):2656-2658.
- [2] Berns M, Toennessen M, Koehne P, et al. Ibuprofen augments bilirubin toxicity in rat cortical neuronal culture [J]. *Pediatr Res*, 2009, 65(4):392-396.
- [3] Spfick MR, Walczak H. The interplay between the bcl-2 family and death receptor-mediated apoptosis [J]. *Biochem Biophys Acta*, 2004, 1644(2/3):125-132. (下转第 3717 页)

kg。有研究表明,静脉注射右旋美托咪啶 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 对疼痛的治疗作用具有封顶效应,同时,注射时间不应该小于 10 min,速度过快可能会相应增加心动过速、心动过缓和高血压的发生^[5]。静脉注射咪达唑仑的剂量为(0.05 mg/kg),此剂量能够维持年龄 30~70 岁的腰部麻醉患者手术中适当镇静和遗忘,而不影响手术期间血流动力学和呼吸的抑制。

本研究表明,静脉注射右旋美托咪啶延长罗哌卡因腰部麻醉感觉阻滞的时间,增加最高感觉阻滞的平面,但是对于这种作用机制并不清楚。脊髓上作用,或是直接镇痛作用,还是血管收缩作用均可能是其潜在的机制。另外,与延长感觉阻滞作用相比,运动阻滞作用的持续时间并未受到影响。可能的原因是相同浓度的右旋美托咪啶对运动神经纤维的抑制作用要轻于对感觉神经纤维的阻滞。这个结论与静脉注射可乐定得出的结论一致^[6]。一些研究报道咪达唑仑可能通过神经传导通路发挥镇痛效应,但是这种作用与给药途径相关。只有经硬膜外或蛛网膜下腔给药才会发挥镇痛效果,全身性用药且不能^[7]。但是根据以往的研究结果表明,右旋美托咪啶的镇痛效应与给药途径无关。本研究发现,静脉注射咪达唑仑不能加强罗哌卡因腰麻的镇痛作用,而腰麻前静脉注射右旋美托咪啶能够提供临床协同效应。

咪达唑仑可能会引起手术中一些患者的不良反应,表现为躁动而非合作,这可能会给手术的操作带来困难。在本研究中并未发现这种异常现象。接受右旋美托咪啶的患者很容易唤醒且合作^[8]。右旋美托咪啶组仅 2 例表现为过度镇静,而咪达唑仑组有 6 例。

静脉注射右旋美托咪啶对血流动力学可能会产生一种双向变化,首先表现为高血压和心动过缓。当中枢效应占主导作用时,血压和心率会轻度降低。但本研究并未出现这种双向效应和明显的循环抑制,原因与慢速注射和手术前的扩容治疗有关,还可能与本研究对象均为健康患者相关^[9]。因此,需要对一些有胃肠道疾病和其他合并症的患者展开进一步研究。有研究表明,右旋美托咪啶几乎不会引起或程度较轻的呼吸抑制。然而使用镇静剂量的咪达唑仑可以产生呼吸暂停和氧饱和度的降低。在本研究中整个手术期间未观察到任何患者出现呼吸频率、 SpO_2 和 Et-CO_2 的改变。

本研究采用患者术后需要首次镇痛药治疗的时间,而非 VAS 评分来评价静脉注射右旋美托咪啶对术后疼痛的影响。镇痛药治疗的标准是使 VAS 评分 ≤ 3 分。在本研究中,24 h 的 VAS 评分各组之间未显示任何差异,但是,手术前给予右旋美托咪啶延长镇痛药治疗的时间,且降低镇痛药的需要量。

综上所述,静脉注射右旋美托咪啶延长罗哌卡因腰麻感觉阻滞的时间,增加最高感觉阻滞的平面。另外,与咪达唑仑组或生理盐水组相比,静脉注射右旋美托咪啶推迟术后首次需要镇痛药治疗的时间,且降低镇痛药的需要量。同时,静脉注射右旋美托咪啶可以提供和咪达唑仑相当的手术中镇静作用。

参考文献:

- [1] Basar H, Akpınar S, Dogancı N, et al. The effects of pre-anesthetic single-dose dexmedetomidine on induction, hemodynamic, and cardiovascular parameters [J]. *J Clin Anesth*, 2008, 20(6): 431-436.
- [2] Coskuner I, Tekin M, Kati I, et al. Effects of dexmedetomidine on the duration of anaesthesia and wakefulness in bupivacaine epidural block [J]. *Eur J Anaesthesiol*, 2007, 24(6): 535-540.
- [3] Memis D, Turan A, Karamanlioglu B, et al. Adding dexmedetomidine to lidocaine for intravenous regional anesthesia [J]. *Anesth Analg*, 2004, 98(3): 835-840.
- [4] Calasans-Maia JA, Zapata-Sudo G, Sudo RT. Dexmedetomidine prolongs spinal anaesthesia induced by levobupivacaine 0.5% in guinea-pigs [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2005, 57(11): 1415-1420.
- [5] Grant SA, Breslin DS, MacLeod DB, et al. Dexmedetomidine infusion for sedation during fiberoptic intubation: a report of three cases [J]. *J Clin Anesth*, 2004, 16(2): 124-126.
- [6] Rhee K, Kang K, Kim J, et al. Intravenous clonidine prolongs bupivacaine spinal anesthesia [J]. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2003, 47(8): 1001-1005.
- [7] Ho KM, Ismail H. Use of intrathecal midazolam to improve perioperative analgesia: a meta-analysis [J]. *Anaesth Intensive Care*, 2008, 36(3): 365-373.
- [8] Ustun Y, Gunduz M, Erdogan O, et al. Dexmedetomidine versus midazolam in outpatient third molar surgery [J]. *J Oral Maxillofac Surg*, 2006, 64(9): 1353-1358.
- [9] Ebert TJ, Hall JE, Barney JA, et al. The effects of increasing plasma concentrations of dexmedetomidine in humans [J]. *Anesthesiology*, 2000, 93(2): 382-394.

(收稿日期:2012-07-02 修回日期:2012-09-18)

(上接第 3714 页)

- [4] Di Nardo A, Benassi L, Magnoni C, et al. Ceramide 2(N-acetyl sphingosine) is associated with reduction in bcl-2 protein levels by Western blotting and with apoptosis in cultured human keratinocytes [J]. *Dermatol*, 2000, 143(3): 491-497.
- [5] Heibein JA, Goping IS, Barry M, et al. Granzyme B-mediated cytochrome c release is regulated by the bcl-2 family members bid and Bax [J]. *J Exp Med*, 2000, 192(10): 1391-1402.

- [6] 冉立伟,谭升顺,王万卷,等.全反式维 A 酸、阿维 A 和他扎罗汀对人黑色素瘤细胞 A375 凋亡和 Bax/Bcl-2 蛋白表达的影响及意义 [J]. *第一军医大学学报*, 2005, 25(8): 972-978.
- [7] 陈乃玲,白玲,邓涛,等.慢性肝病肝细胞凋亡 Fas、FasL、Bax、Bcl-2、Bcl-xl、Bcl-2 等蛋白表达 [J]. *中华传染病杂志*, 2003, 21(2): 122-124.

(收稿日期:2012-06-13 修回日期:2012-09-12)