

文章编号:1005-6947(2005)08-0591-04

· 实验研究 ·

犬胆管腔内放射对 BCL-2 基因表达的影响及其与平滑肌细胞凋亡的关系

何贵金¹, 鞠光², 高沁怡³, 许书河⁴, 高红⁵, 姜维国⁶, 蒋涛⁵, 戴显伟¹, 马凯¹

(中国医科大学第二临床学院 1. 普通外科 5. 小儿外科试验室 6. 病理科, 辽宁 沈阳 110004; 2. 辽宁省沈阳市新城子区医院 外科, 辽宁 沈阳 110013; 3. 中国医科大学第一临床学院 同位素室, 辽宁 沈阳 110001; 4. 中国原子能研究院 同位素研究室, 北京 100050)

摘要:目的 探讨 γ 射线对犬 BCL-2 基因的影响及其与胆管壁增殖平滑肌细胞凋亡的关系和意义。方法 将¹⁰³钯(¹⁰³pd)放射性支架和普通支架分别植入犬的肝外胆管内;取出胆管标本,用免疫组化方法检测 γ 射线诱导的胆管壁增殖平滑肌细胞中的 BCL-2 基因,并检测凋亡细胞数量,计算机图象检测系统检测两组胆管腔面积。结果 ¹⁰³pd 支架组胆管组织中 BCL-2 基因表达较普通支架组为弱;BCL-2 基因低表达组犬胆管出现增殖平滑肌细胞明显凋亡;肝外胆管无明显狭窄;BCL-2 基因高表达组胆管未出现增殖平滑肌细胞明显凋亡,而肝外胆管有明显狭窄。结论 实验犬 BCL-2 基因表达水平与细胞凋亡的发生和细胞对辐射敏感性有关;¹⁰³pd 放射性支架通过降低 BCL-2 基因表达,促进胆管增殖平滑肌细胞凋亡,从而抑制肝外胆管狭窄。

关键词:胆管/辐射效应; γ 射线; 细胞凋亡; 基因, BCL-2

中图分类号: R322.4; R812

文献标识码: A

The effect of intracholangial radiation on the expression of BCL-2 in dogs and its relationship to apoptosis of smooth muscle cells

HE Gui-jin¹, JU Guang², Gao Qin-yi³, XU Shu-he⁴, GAO Hong⁵, JIANG Wei-guo⁶, JIANG Tao⁵, DAI Xian-wei¹, MA Kai¹

(1. Department of General Surgery, 5. Laboratory of Pediatric Surgery, 6. Department of Pathology, Second Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang, 110004, China; 2. Department of General Surgery, Xin Chengzi Hospital, Shenyang 110013, China; 3. Atomic Energy Research Institute, the First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China; 4. Department of isotopic Medicine, Atomic Energy Research Institute of China, Beijing 100050, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of BCL-2 γ -radiation on BCL-2 gene in dogs, and its relationship and significance on apoptosis of proliferated smooth muscle cells of bile duct wall. **Methods** The ¹⁰³Pd radioactivity stent (experiment group) or ordinary stent (control group) was positioned into the target segment of bile duct. The injured bile duct segments were dissected free from the dogs, and BCL-2 gene in the control and γ -radiation-induced apoptotic smooth muscle cells of bile duct wall was analysed by using immuno-histochemical technique. The number of apoptotic cells was counted, and size of lumen of bile duct in both groups was measured by a computerized imaging system. **Results** BCL-2 gene expression was weaker in the ¹⁰³Pd radioactive stent group than in the ordinary stent group. The group of dogs with low expression of BCL-2 genes showed marked apoptosis of proliferated smooth muscle cells of bile duct and there was no overt stenosis of extrahepatic bile ducts. The group that showed high expression of BCL-2 gene did not show marked apoptosis of proliferated smooth muscle cells of bile duct, and there was marked stenosis of extrahepatic bile duct. **Conclusions** The expression level of BCL-2 in experimental dogs is related to the development of cellular apoptosis and to radiation sensitivity of the cells. ¹⁰³Pd radioactive stent can reduce the expression of BCL-2 gene, promote apoptosis of proliferated smooth muscle cells of bile duct, and suppress stricture formation of extrahepatic bile duct.

收稿日期:2005-03-09; 修订日期:2005-07-04。

作者简介:何贵金(1964-),男,辽宁沈阳人,中国医科大学附属二院副主任医师,主要从事肝胆疾病方面的研究。

通讯作者:何贵金 电话:13940428075(手机); E-mail:23318199@163.com。

Key words: Bile Duct/rad eff; γ -radiation; Apoptosis; Genes, BCL-2

CLC number: R322.4; R812

Document code: A

胆管再狭窄是局部胆管损伤后的一种修复反应,是多种细胞因子和生长因子介导的局部胆管重建和再塑,是胆管平滑肌细胞的迁移、增殖的结果^[1]。对胆管再狭窄机制及防治的研究是目前重要的领域。胆管腔内放射可治疗和预防胆管再狭窄,辐射可引起胆管平滑肌细胞凋亡。目前,大量实验证明^[2], BCL-2 为重要的抗凋亡因子,定位于线粒体膜的 BCL-2 蛋白质可通过调节线粒体功能而制约着凋亡的发生。本研究以开发国产放射性支架为目的,通过动物实验探讨 γ 射线抑制 BCL-2 基因表达,引起辐射诱导胆管壁增殖平滑肌细胞凋亡,以防治胆管损伤后胆管狭窄。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康本地杂种犬 12 只,雌、雄不限,体重 15 ~ 20 kg (中国医科大学附属第二医院动物实验室提供) 动物随机分成 2 组,每组 6 只,用 846 麻醉药按体重 0.10 ~ 0.15 mL/kg, 肌内注射麻醉动物,然后采用上腹纵行切口逐层进入腹腔;寻找幽门,在其下 2 ~ 3 cm 处切开十二指肠壁,找到胆总管末端开口,插入球囊导管;于胆总管内,通过压力泵向球囊内注入生理盐水,维持压力 5 cmH₂O (1 cmH₂O = 0.098 kPa),造成犬胆管黏膜撕裂;损伤胆总管后抽出囊内液体,使压力为零。重复上述损伤过程 2 次,然后退出球囊导管。普通支架组用 11F 释放器将普通镍钛记忆合金支架(中国科学院沈阳金属研究所研制)从胆总管末端开口处释放到胆总管内。

1.1.2 ¹⁰³Pd 支架组 用直径 0.25 mm 的镍钛记忆合金丝,单丝编织成 3 mm × 40 mm 的螺旋状支架,经过定形、焊接、热处理、酸洗、清洗、吹干、检验等工序制成成品。用镍钛记忆合金支架将 ¹⁰³Pd (由中国原子能研究院同位素研究所提供)由加速器将质子打入 ¹⁰³Rh 并释放 1 个中子生成 [¹⁰³Rh(p, h)¹⁰³Pd],但须经化学方法提纯 ¹⁰³Pd 含量。¹⁰³Pd 的能量在 21 ~ 23 keV,释放低能量 γ 射线,半衰期为 17 d;衰变后转为稳定态的 ¹⁰³Rh。采用化学电镀方法将上述 ¹⁰³Pd 电镀于支架上,通过电镀液含 ¹⁰³Pd 的浓度及电镀时间控制支架表面 ¹⁰³Pd 的量以达到金属支架释放低能量 γ 射线所需浓度。共 10 个 ¹⁰³Pd 支架。¹⁰³Pd 的放射性活度为 12.5 × 10⁴ kBq, ¹⁰³Pd 支架植入犬胆管同普通支架组。

1.1.3 动物喂养 两组动物术后继续喂养,预防感染治疗 3 d,术后 30 d 同时处死。

1.1.4 组织形态学分析 术后 30 d 从两组处死的动物中,取出部分胆管并用 10% 福尔马林溶液固定石蜡包埋,制备成 HE 切片。通过计算机图像分析软件测定两组以下指标:总胆管腔面积、胆管内膜厚度、残余胆管腔面积、狭窄程度[(1 - 残余管腔面积)/总管腔面积之比]及胆管腔周长。

1.1.5 主要试剂 细胞凋亡检测试剂盒购自武汉博士德生物公司。BCL-2 免疫组织化学试剂盒购自武汉博士德生物公司。

1.2 方法

1.2.1 BCL-2 免疫组化染色 DAB 显色,用兔抗 BCL-2 基因抗原的抗体, BCL-2 免疫组化染色后细胞浆呈棕褐色者为阳性细胞,细胞浆无棕褐色染色者为阴性细胞。阳性细胞记数分三级:低倍镜(× 10) 1 cm² 视野阳性细胞数小于 1/3 为(+), 1/3 ~ 2/3 为(++), 大于 2/3 为(+++)。

1.2.2 凋亡细胞原位标记实验(TUNEL) 用原位细胞凋亡检测试剂盒(罗氏公司)。结果判断:细胞核中有棕黄色浓染者为阳性细胞。记数方法:高倍镜下记数单位视野 TUNEL 阳性细胞,3 次记数求平均值。

1.3 统计学方法

所有数据均用平均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。BCL-2 阳性结果的差异用 χ^2 检验,计量指标采用计算机 SAS 软件系统进行 *t* 检验,

2 结果

2.1 两组胆管壁平滑肌细胞凋亡的比较

¹⁰³Pd 支架组平滑肌细胞凋亡数为 87.9 ± 7.96,显著高于普通支架组的 5.6 ± 0.51(图 1),两组差异有显著性($P < 0.05$)。

2.2 BCL-2 在两组胆管组织中的表达

普通支架组胆管组织中 BCL-2 的基因表达的明显高于 ¹⁰³Pd 支架组(图 2),差异有显著性($P < 0.05$)(表 1)。

表 1 BCL-2 在两组胆管组织中的表达

组别	n	BCL-2 表达				BCL-2 阳性细胞表达率%
		(+++)	(++)	(+)	(-)	
¹⁰³ Pd 支架	6	0(0/6)	0(0/6)	1(1/6)	5(5/6)	16.66
普通支架	6	1(1/6)	3(3/6)	1(1/6)	1(1/6)	83.33

图1 ¹⁰³Pd 支架组胆管组织平滑肌凋亡细胞染色(手术后30d)

图2 普通支架组犬胆管组织 BCL-2 染色(手术后30d)

2.3 两组胆管组织形态分析

球囊扩张30d后,同普通支架组比较,¹⁰³pd 支架组胆管最大内膜厚度显著减少(78.33%, $P < 0.01$)(图3,图4)。普通支架组和¹⁰³pd 支架组胆管最大狭窄面积百分比分别为(56.54 ± 22.32)%

和($23.47\% \pm 15.65$)%,差异有极显著性($P < 0.01$)(表2)。¹⁰³pd 支架组胆管腔周长及胆管腔面积均比对普通支架组明显增加(88.24% , $P < 0.01$; 91.52% , $P < 0.01$)(表3)。

图3 ¹⁰³Pd 支架组胆管内膜增生情况(手术后30d不明显)

图4 普通支架组胆管内膜增生情况(手术后30d明显)

表2 胆管内放射对球囊扩张术后30d胆管形态的影响

组别	n	胆管(支)	最大内膜厚度(mm)	P值	胆管狭窄程度(%)	P值
普通支架	6	6	1.86 ± 0.14	<0.01	54.73 ± 21.64	<0.01
¹⁰³ pd 支架	6	6	0.78 ± 0.12		17.61 ± 14.52	

表3 胆管内放射对球囊扩张术后30d胆管腔狭窄的影响

组别	n	胆管(支)	胆管腔周长(mm)	P值	胆管腔面积(mm ²)	P值
普通支架	6	6	6.94 ± 1.37	<0.01	3.48 ± 1.75	<0.01
¹⁰³ pd 支架	6	6	9.66 ± 1.58		5.31 ± 1.94	

3 讨论

BCL-2 基因在细胞凋亡调节过程中起重要作用。它是一种凋亡抑制基因,可抑制多种因素包括辐射诱导的凋亡,故也称为存活,在正常情况下,以 BCL-2 异源二聚体形式存在,当 BCL-2 增加时,BCL-2 同源二聚体升高,细胞趋于存活。BCL-2 定位于线粒体膜的 BCL-2 蛋白质可通过调节线粒体功能而制约着凋亡的发生^[3]。有研究指出^[4],电离辐射引起 DNA 分子损伤,激活 p53 蛋白发挥转录子作用,使 BCL-2 表达下降,而使 Caspase-3 激活,导致细胞凋亡。BCL-2 蛋白质也是 Caspase-3 的底物之一,激活的 Caspase-3 通过降解 BCL-2 蛋白,进一步减少 BCL-2 蛋白的量。研

究认为^[5] BCL-2 抗凋亡的机制有:抑制膜内 Ca^{2+} 的释放,抗氧化,细胞内细胞色素 C 的释放,通过抑制白细胞介素-1 转化酶的自身催化而抑制细胞凋亡。本研究结果显示,普通支架组胆管平滑肌细胞中 BCL-2 的表达明显高于¹⁰³ Pd 支架组,而有着较明显的胆管平滑肌细胞凋亡的¹⁰³ Pd 支架组其 BCL-2 表达反而不如胆管平滑肌细胞凋亡不明显的普通支架组。提示 BCL-2 的表达与平滑肌细胞凋亡作用方向相悖;同时提示辐射可以抑制 BCL-2 基因的表达,从而引起胆管损伤后增殖平滑肌细胞凋亡的发生。

¹⁰³pd 支架组在球囊扩张术后 30d 发现,其胆管腔面积比普通支架组明显增加,胆管狭窄程度比普通支架组小,这主要是由于¹⁰³ pd 辐射抑制 BCL-2 基因表达,诱导增殖平滑肌细胞凋亡,从而减轻胆管损伤后胆道愈合过程中的管腔狭窄,此结果说明胆管内放射治疗对胆管损伤后胆管狭窄

有明显的抑制作用。

参考文献:

- [1] Eissman JL, Old Problems, new techniques: The ingterventional radiologist and the lacrimal apparatus [J]. Radiology, 2003, 212(11): 305-306.
- [2] Nicolson DW, Thornberry NA. Caspase: Killer proteases [J]. Trend Biochem Sci, 2000, 22(8): 299-306.
- [3] Gajewski TF, Thompson CB. Apoptosis meets signal transduction: elimination of a BAD influence [J]. Cell. 2001, 87(4): 589-599.
- [4] Rodriquez I, Matsuur A, Knatib K, *et al.* BCL-2 transgene expressed in hepatocyte proteins mice from fulminant liver destruction but not from rapid death induced by anti-Fas antibody injection [J]. J Exp Med, 1996, 183(3): 1030-1036.
- [5] Golstein P. Controlling Cell Death [J]. Science, 1997, 275(5303): 1081-1082.

2006 年《实用骨科杂志》征订启事

《实用骨科杂志》由中华医学会山西分会和北京大学第三医院主办、山西医科大学第二医院承办。本刊设有论著、实验研究、经验、短篇、个案、基层园地、麻醉、护理、影像、骨科史萃等栏目,宗旨是以使用和普及为主,兼顾提高。本刊大 16 开版,96 页,铜版纸印刷,每册 8.50 元,全年 6 册,共 51.00 元。双月刊,逢双月 25 日出版,全国各地邮局(所)均可订阅,如有不便,也可向编辑部邮购。

中国标准连续出版物号:ISSN 1008-5572/CN 14-1223/R 国内邮发代号:22-174 国外代号:BM 1449
 邮编:030001 地址:山西省太原市五一路 382 号山西医科大学第二医院内《实用骨科杂志》编辑部 E-mail:SGKZ@Chinajournal.net.cn http://SGKZ.Chinajournal.net.cn 电话:0351-3365705,0351-3072133 传真:0351-3072133。

《临床外科杂志》征订启事

《临床外科杂志》是由中华医学会湖北分会主办,全国公开发行的临床外科专业性学术类期刊,为国家科学技术部中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊),被中国学术期刊(光盘版)、万方数据数字化期刊群和中文科技期刊数据库全文收录。并荣获首届《CAJ-CD 规范》执行优秀期刊奖。国际标准刊号:ISSN1005-6483,国内统一刊号:CN42-1334/R。本刊以“面向临床,指导临床,服务临床”为宗旨,报道外科领域中最新的科研成果和临床诊治经验,密切结合临床实践,对外科临床和科研工作有很强的指导作用。辟有述评、专题笔谈、论著、术式介绍、技术革新、讲座、综述、会议(座谈)纪要、临床病例讨论、教学查房、学术争鸣、国内外学术动态、基层医院经验、病例报告、问题解答、新期刊文献、书评等栏目。

本刊自 2004 年起改为月刊。欢迎广大读者及时到当地邮局订阅(邮发代号 38-184),每册定价 6.5 元。如错过邮局订阅时间可随时向本刊编辑部邮购。

编辑部地址:湖北省武汉市武昌丁字桥路 100 号,邮政编码:430064,联系电话:027-87893476,传真:027-87893470, E-mail: hbyxh@public.wh.hb.cn 或 lwen62@vip.sina.com