

海洛因依赖对大鼠颌下腺 Bcl-2 和 Bax 表达的影响^{*}

胡 赟^{**}, 梁文妹, 洪 艳, 韩 晶, 夏白娟, 李一欣

(贵阳医学院 组织学与胚胎学教研室, 贵州 贵阳 550004)

[摘 要] **目的:** 观察海洛因依赖对大鼠颌下腺 Bcl-2、Bax 阳性细胞表达及分布的影响。**方法:** 正常 SD 大鼠, 随机分为正常对照组和海洛因依赖组, 皮下注射海洛因建立海洛因依赖大鼠模型, 分别于第 10、17、24、31、38 天取颌下腺组织, 用免疫组织化学 Envision 法并结合图像分析方法, 观察 Bcl-2 和 Bax 表达。**结果:** (1) Bcl-2 阳性细胞数量在海洛因依赖第 10 天明显下降 ($P < 0.05$), 此后开始增加, 至第 24 天时达最高峰 ($P < 0.05$), 而在第 38 天时低于正常水平 ($P < 0.05$); 平均灰度值在依赖第 10 天明显上升 ($P < 0.05$), 后开始下降, 第 24 天时达最低值 ($P < 0.05$), 至第 31~38 天时接近正常水平 ($P > 0.05$); (2) Bax 阳性细胞数量在依赖第 10 天明显降低 ($P < 0.05$), 第 17 天时又增加达峰值 ($P < 0.05$); 之后即开始下降, 第 31-38 天时接近正常水平 ($P > 0.05$); 其平均灰度值在依赖第 10 天显著上升 ($P < 0.05$), 而在第 17 天时达最低值 ($P < 0.05$), 后随依赖时间延长, 与正常水平无显著性差异 ($P > 0.05$)。**结论:** 海洛因对颌下腺 Bcl-2、Bax 的表达有明显影响, 且与依赖时间长短有关。

[关键词] 颌下腺; 海洛因; Bcl-2; Bax; 免疫组织化学; 大鼠, Sprague-Dawley

[中图分类号] R361.2; R36-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2013)03-0239-04

Effect of Heroin Dependence on Expression of Bcl-2 and Bax in Submandibular Gland of Rats

HU Yun, LIANG Wenmei, HONG Yan, HAN Jing, XIA Baijuan, LI Yixin

(Department of Histology and Embryology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of heroin dependence on Bcl-2 and Bax positive cells in the submandibular gland of rats. **Methods:** Normal SD rats were divided into normal control group (NGC) and heroin dependence group (HDG). The heroin dependent model of rats was established by subcutaneous injection of heroin, and submandibular glands were excised on the following 10th, 17th, 24th, 31st and 38th days respectively. Immunohistochemical Envision method and image analysis were used in the study. **Results:** 1. The number of Bcl-2 positive cells descended obviously on the 10th d ($P < 0.05$), then, increased and peaked on the 24th d ($P < 0.05$). However, it was lower than that of NCG on the 38th d ($P < 0.05$); the mean grey value increased obviously on the 10th d ($P < 0.05$), but decreased and to the lowest on the 24th d ($P < 0.05$). Between the 31st d and the 38th d, it approached normal level ($P > 0.05$). 2. The number of Bax positive cells descended obviously on the 10th d ($P < 0.05$), then increased and peaked on the 17th d ($P < 0.05$). Between the 31st d and the 38th d, it approached normal level ($P > 0.05$); The mean grey values increased obviously on the 10th d ($P < 0.05$), but decreased to the lowest on the 17th d ($P < 0.05$). Along with the extension of heroin dependence, it kept the level similar with that of normal ($P < 0.05$). **Conclusions:** Heroin dependence affects the expression of Bcl-2 and Bax in submandibular gland, and it relates to the dependence time, which suggests that Bcl-2 and Bax in submandibular gland of rat are involved in regulation process to body injury caused by heroin dependence.

^{*} [基金项目] 贵州省教育厅基金资助项目 黔科教 20090135

^{**} 通信作者 E-mail: huyun0403@163.com

[Key words] submandibular gland; heroin; Bcl-2; Bax; immunohistochemistry; rats, Sprague-Dawley

颌下腺是近年来研究得最多的具有内分泌功能的腺体之一,其分泌的多种生物活性物质对机体多种生理功能均有重要的调节作用。众所周知,海洛因对机体多个器官系统均有损害,且滥用范围广泛,危害程度严重。Bcl-2、Bax 是一对参与调节细胞凋亡过程的细胞因子,Bcl-2 高表达抑制凋亡,Bax 高表达则促进凋亡^[1]。迄今为止,尚未见有关海洛因依赖对颌下腺 Bcl-2、Bax 细胞形态及其功能影响的报道,2012 年通过建立海洛因依赖大鼠模型,应用免疫组织化学 Envision 方法,观察海洛因依赖对大鼠颌下腺 Bcl-2、Bax 阳性细胞定位、分布特点及反应强度的影响,探讨海洛因依赖对机体细胞损伤与颌下腺内分泌细胞间的关系,以便为进一步研究颌下腺神经内分泌功能提供一定的形态学资料。

1 材料与方法

1.1 海洛因依赖大鼠模型建立^[2]

成年 SD 大鼠 36 只,体重 180 ~ 220 g,贵阳医学院动物实验中心提供。按配对原则随机分为正常对照组(NCG) 6 只,海洛因依赖组(HDG) 30 只。每组雌雄各半,雌雄分笼。依赖组皮下注射海洛因液,首日剂量为 3 mg/kg,1 日 2 次(上午 8:00,下午 3:00),连续 9 d 至成瘾,第 9 天剂量为 27 mg/kg。此后每日上午 8:00 皮下注射海洛因 1 次,维持剂量为 27 mg/kg。所用海洛因纯度为 61.48%,由贵州省公安厅提供。正常对照组不予任何处理,按时喂养。

1.2 取材和标本制备

正常对照组 6 只,海洛因依赖组分别于第 10、17、24、31、38 天取材,每次处死 6 只,雌雄各半。生理盐水灌洗,Bouin 液灌注固定后取颌下腺,Bouin 液再固定,常规石蜡包埋,制成 4 μ m 厚连续切片。免疫组织化学单染法每例观察切片 3 张以上,切片间隔 56 μ m。

1.3 免疫组织化学 Envision 法染色

主要步骤:10% 甲醇-过氧化氢室温 10 min,正常羊血清(1:50)室温 30 min,兔抗 Bcl-2(1:100)、兔抗 Bax(1:100)分别于室温 30 min,滴加 2 倍稀释二抗于室温 30 min,DAB-H₂O₂ 液显色,苏

木精复染,封片。方法对照:以 PBS 缓冲液代替特异性抗血清,余步骤相同。

1.4 图像分析

随机选取第 10、17、24、31、38 天依赖组大鼠颌下腺切片各 5 张,正常对照组雌雄大鼠颌下腺切片各 3 张,应用 BioMias 图像分析系统进行检测。在 40 倍物镜下,每张切片随机选取 5 个视野,测得 Bcl-2、Bax 阳性细胞平均灰度值,并计数每个视野内的有核阳性细胞数及有核细胞总数。所得数据用 SPSS 10.0 软件包进行统计分析。

2 结果

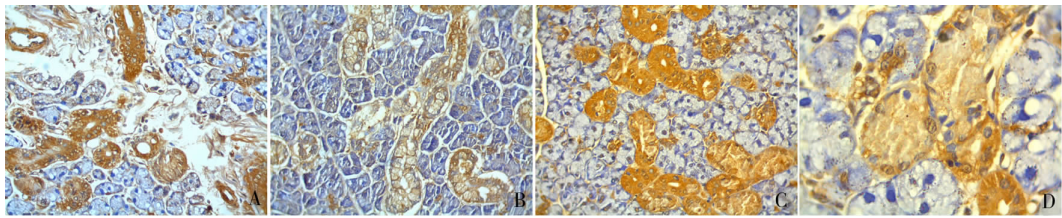
2.1 免疫组织化学观察

2.1.1 Bcl-2 阳性细胞 正常对照组大鼠颌下腺 Bcl-2 阳性细胞经 DAB-H₂O₂ 染色,阳性产物呈棕黄色颗粒状,主要位于导管细胞胞质中,其反应物强弱不等,浆液性腺泡细胞胞质也有少量阳性产物,黏液性腺泡细胞为阴性(图 1A)。海洛因依赖组 Bcl-2 阳性细胞定位基本与正常组对照大鼠一致,但其数量及反应强度发生了明显变化。海洛因依赖第 10 天时,Bcl-2 阳性细胞数量减少,反应强度减弱,其后随依赖时间延长,细胞数量及反应强度逐渐增加;至依赖第 24 天时,明显高于正常对照组,且少量颗粒曲管细胞胞质中可见大小不等、近似圆形的阳性反应颗粒;依赖第 31、38 天时,Bcl-2 阳性细胞阳性反应强度开始减弱,颗粒曲管细胞胞质中多见染色浅淡的阳性反应颗粒(图 1B-C)。

2.1.2 Bax 阳性细胞 正常对照组大鼠颌下腺 Bax 阳性细胞数量少,反应强度弱,主要分布于导管细胞胞质中,少量浆液性腺泡细胞胞质也呈阳性反应,黏液性腺泡为阴性(图 2A)。海洛因依赖第 10 天,Bax 阳性细胞数量减少,反应强度减弱;第 17 天时,细胞数量明显增加,强度增强;第 24、38 天时,Bax 阳性细胞反应强度开始减弱(图 2B-D)。

2.2 图像分析

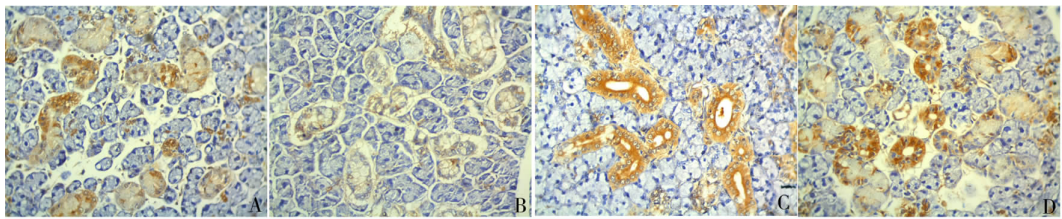
2.2.1 Bcl-2、Bax 阳性细胞数量的图像分析 如图 3 所示,Bcl-2、Bax 阳性细胞数量在海洛因依赖期间发生了明显变化,且二者变化趋势较相似。在依赖第 10 天,Bcl-2 阳性细胞数量显著下降($P < 0.05$),此后开始增加;在第 24 天时达最高峰($P <$



A. 正常对照组 B. 海洛因依赖第 10 天 C. 海洛因依赖第 24 天 D. 海洛因依赖第 38 天

图 1 各组大鼠颌下腺 Bcl-2 阳性细胞的表达 (Envision, ×400)

Fig. 1 The Bcl-2 positive cells in rats' submandibular gland of each group (Envision, ×400)



A. 正常对照组 B. 海洛因依赖第 10 天 C. 海洛因依赖第 17 天 D. 海洛因依赖第 38 天

图 2 各组大鼠颌下腺 Bax 阳性细胞的表达 (Envision, ×400)

Fig. 2 The Bax positive cells in rats' submandibular gland of each group (Envision, ×400)

0.05); 依赖第 31 天时细胞数量与正常对照组相比无显著性差异 ($P > 0.05$); 第 38 天细胞数量明显低于正常水平 ($P < 0.05$)。Bax 阳性细胞数量在依赖第 10 天也明显降低 ($P < 0.05$), 但在第 17 天时增加达峰值 ($P < 0.05$); 第 24 天时开始下降, 但仍高于正常对照组 ($P < 0.05$); 第 31 ~ 38 天时细胞数量下降接近正常水平 ($P > 0.05$)。

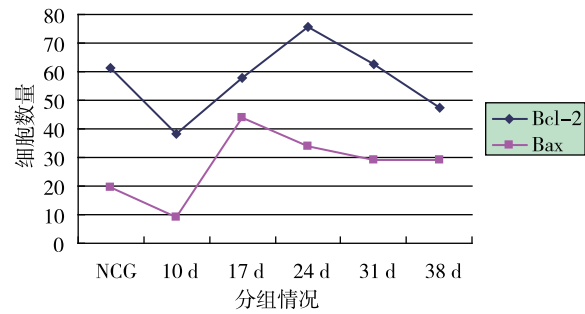


图 3 各组大鼠颌下腺 Bcl-2、Bax 阳性细胞数量比较

Fig. 3 Comparison of positive cell numbers of Bcl-2 and Bax in submandibular gland of rats in different groups

2.2.2 Bcl-2、Bax 阳性细胞平均灰度值 如图 4 所示,在海洛因依赖期间,Bcl-2、Bax 阳性细胞平均灰度值变化趋势相似。依赖第 10 天,Bcl-2 阳性细胞平均灰度值明显上升 ($P < 0.05$) 后开始下降;在第 24 天时达最低值 ($P < 0.05$);第 31 ~ 38 天时与

正常水平相接近 ($P > 0.05$)。Bax 阳性细胞平均灰度值在依赖第 10 天也显著上升 ($P < 0.05$),但在第 17 天时达最低值 ($P < 0.05$);其后随依赖时间延长,与正常水平无显著性差异 ($P > 0.05$)。

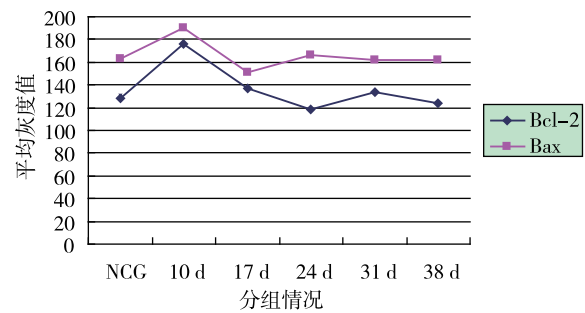


图 4 各组大鼠颌下腺 Bcl-2、Bax 阳性细胞平均灰度值比较

Fig. 4 Comparison of mean grey degree vlaues of Bcl-2 and Bax positive cells in submandibular gland of ratsin different groups

3 讨论

Bcl-2 和 Bax 基因分别是 Bcl-2 家族中最具有代表性的抑凋亡基因和促凋亡基因,也是目前最受重视的调控细胞凋亡的基因家族^[3]。原癌基因 Bcl-2 是重要的凋亡相关基因,其产生的 Bcl-2 蛋白的生理功能主要是抑制细胞凋亡,延长细胞寿

命;Bax 的生物学作用是拮抗 Bcl-2,促进细胞凋亡。Bcl-2 和 Bax 蛋白水平的高低与凋亡调控直接相关^[4]。

本实验结果表明,颌下腺有 Bcl-2 表达,且与海洛因依赖时间有关。在海洛因依赖第 10 天,颌下腺 Bcl-2 阳性表达减弱,图像分析结果显示阳性细胞数量明显减少,平均灰度值增加,表明此时颌下腺内 Bcl-2 减少;在海洛因依赖第 24、31 天,Bcl-2 阳性细胞数量增加,平均灰度值下降,尤以第 24 天明显,表明在此期间颌下腺合成 Bcl-2 增多;而在第 38 天时,Bcl-2 阳性细胞数量较正常组减少,平均灰度值增加,Bcl-2 阳性表达减弱,且第 24 ~ 38 天时观察到颗粒曲管细胞胞质中染色浅淡的阳性反应颗粒逐渐增加,提示为 Bcl-2 排空后所致。自第 17 天开始,颌下腺合成 Bcl-2 增加,24 天时达高峰,之后随着 Bcl-2 的排出,颌下腺表达 Bcl-2 减弱。可见海洛因依赖对颌下腺合成和分泌 Bcl-2 有明显影响,且与依赖时间有关。海洛因依赖对机体多个器官系统均有显著损害,引起组织细胞变性坏死等病理改变。何国珍等报道^[5],海洛因引起大鼠脑神经元肿胀、变性、凋亡。故推测颌下腺表达 Bcl-2 增加,可能是机体对海洛因依赖的一种代偿反应,Bcl-2 可能通过自分泌或旁分泌作用于颌下腺自身细胞,或通过血循环作用于相应的组织细胞,发挥其抗细胞凋亡的生物学作用。

在正常情况下,颌下腺也表达 Bax,但其阳性细胞数量少,反应强度弱。图像分析结果显示,海洛因依赖第 10 天,Bax 阳性细胞数量明显减少,平均灰度值增加,表明颌下腺合成 Bax 减少;第 17 天,细胞数量增加,平均灰度值减少,颌下腺合成 Bax 增多;由于 Bcl-2 及 Bax 在此期间的变化趋势相似,提示二者共同参与调节此期间海洛因依赖对机体组织细胞的影响。依赖第 24 天,Bax 阳性细胞数量虽仍高于正常对照组,但其平均灰度值已接近正常水平;而第 31、38 天时,细胞数量及平均灰度值均与正常水平无差异,表明在此期间,颌下腺内 Bax 的表达无明显改变。García-Fuster MJ^[6]等的研究表明,长期滥用鸦片患者脑内 Bax 水平无明

显变化,本实验室结果与之较相符。Wang Y 等报道,海洛因依赖子代小鼠海马 Bcl-2 表达明显下降,而 Bax 表达显著升高^[7],与本实验结果不同,推测是由于海洛因依赖时间长短不同所致。

综上所述,海洛因依赖对颌下腺 Bcl-2、Bax 的表达水平有明显影响,且与依赖时间长短有关,推测这种改变与海洛因依赖对机体组织细胞造成的损伤有关,颌下腺表达的 Bcl-2 及 Bax 可能参与了机体细胞凋亡的调节过程,但其具体的作用机制尚有待于进一步研究探讨。

4 参考文献

- [1] Bravo-Cuellar A, Hernández-Flores G, Lerma-Díaz JM, et al. Pentoxifylline and the proteasome inhibitor MG132 induce apoptosis in human leukemia U937 cells through a decrease in the expression of Bcl-2 and Bcl-XL and phosphorylation of p65 [J]. J Biomed Sci, 2013(1):13.
- [2] 潘贵书,徐国强,李淑芳. 海洛因成瘾大鼠模型的建立[J]. 贵阳医学院学报,1997(增刊):46.
- [3] Young Park S, Jeong YJ, Kim SH, et al. Epigallocatechin gallate protects against nitric oxide-induced apoptosis via scavenging ROS and modulating the Bcl-2 family in human dental pulp cells [J]. J Toxicol Sci, 2013(3):371 - 378.
- [4] Papachristou F, Chatzaki E, Petrou A, et al. Time course changes of anti- and pro-apoptotic proteins in apigenin-induced genotoxicity [J]. Chin Med, 2013(1):9.
- [5] 何国珍,韦献良,李静玲. 海洛因成瘾致大鼠脑损伤机制的探讨[J]. 广西医科大学学报,2007(6):835 - 837.
- [6] García-Fuster MJ, Ramos-Miguel A, Rivero G, et al. Regulation of the extrinsic and intrinsic apoptotic pathways in the prefrontal cortex of short- and long-term human opiate abusers [J]. Neuroscience, 2008(1):105 - 119.
- [7] Wang Y, Han TZ. Prenatal exposure to heroin in mice elicits memory deficits that can be attributed to neuronal apoptosis [J]. Neuroscience, 2009(2):330 - 338.

(2013-03-18 收稿,2013-05-17 修回)

编辑:文箫颖