

# 缺血再灌注对大鼠腮腺导管细胞 TGF- $\beta_1$ 、Bcl-2 表达的影响

马宏伟<sup>1</sup>, 王春艳<sup>2\*</sup>, 吕翔<sup>3</sup>, 吕美娃<sup>1</sup>

1 中国中医科学院望京医院口腔科, 北京 100102; 2 承德医学院组胚教研组;

3 中国石油天然气集团公司中心医院口腔科

**摘要:**目的 探讨缺血再灌注损伤对大鼠腮腺导管细胞 TGF- $\beta_1$ 、Bcl-2 表达的影响。方法 wistar 大鼠经颈总动脉结扎造成腮腺缺血再灌注模型, 应用免疫细胞化学及一般光镜技术, 分别观察缺血 0.5h 和 1h, 再灌注 6h (早期)、12h (中期) 和 24h (后期) 腮腺导管上皮细胞的 TGF- $\beta_1$  和 Bcl-2 的动态表达情况及一般形态学变化。**结果** 1. TGF- $\beta_1$ : 缺血再灌注组较对照组 TGF- $\beta_1$  表达明显提高 ( $P < 0.01$ ), 且随缺血时间的延长, TGF- $\beta_1$  的表达呈逐渐增高趋势; 组间比较, 缺血 1h 比 0.5h 组表达提高 ( $P < 0.01$ ); 再灌注各组间两两比较均无显著差异 ( $P > 0.05$ )。2. Bcl-2: 再灌注 6h 组的表达较对照组明显增高 ( $P < 0.05$ ), 而再灌注 12h、24h 较对照组无明显差异 ( $P > 0.05$ ); 组间比较, 缺血时间 0.5h 与 1h 组、再灌注各组间的两两比较均无显著差异 ( $P > 0.05$ )。3. 形态学: 与对照组正常形态比较, 实验组在缺血再灌注早期开始出现腺泡细胞萎缩、坏死等形态学改变, 中期明显, 后期修复。导管上皮细胞变化较轻。**结论** 缺血再灌注可明显提高大鼠腮腺导管细胞 TGF- $\beta_1$  的表达; 缺血时间越长, TGF- $\beta_1$  表达上调越明显; 缺血再灌注使 Bcl-2 的表达在早期明显升高; 而中晚期 Bcl-2 的表达无显著变化; 缺血再灌注对 TGF- $\beta_1$  和 Bcl-2 表达的影响可能与形态学变化有关。

**关键词:**大鼠; 腮腺; 导管上皮细胞; 缺血再灌注; TGF- $\beta_1$ ; Bcl-2

**Expression of TGF- $\beta_1$  and Bcl-2 on parotid gland conduct epithelial cells in rat with experimental perfusion after ischemia**

MA Hong-wei, WANG Chun-yan, LV meiwa

Ma Hong Wei, Department of stomatology, Wangjing Hospital, China Academy of

基金: 廊坊市科技局资助项目 (项目编号: 2014013018)

作者简介: 马红伟 (1969-), 女, 河北承德人, 硕士学历, 副主任医师, 研究方向: 口腔疾病的分子病理学

通讯作者: 王春艳 (1960-), 女, 教授, 硕士生导师, 主要从事神经内分泌学研究, ycw23922@163.com

**Abstract:****Objective:** To observe the expression of TGF- $\beta_1$ , Bcl-2 in experimental ischemia and perfusion in rat parotid gland duct epithelial cells, to investigate the relationship between the expression and morphological change. **Methods:** Ninety rats were performed the bilateral neck arteries tied and divided into 9 groups randomly. The morphological changes of parotid gland and the expression of TGF- $\beta_1$ , Bcl-2 were observed by using light microscope (LM) and immunohistochemistry. **Results:** Under the condition of the same perfusion time, the expression of TGF- $\beta_1$  increased at perfusion 0.5 h and 1 h. Under the condition of the same ischemia time, expressions of TGF- $\beta_1$  and Bcl-2 didn't change obviously at early and middle, last phases; but the expression of Bcl-2 increased at early phase only. At the earlier and middle stage of parotid injured of ischemia and perfusion, the parotid acinar cells showed morphological changes. At last the experimental group underwent repair. **Conclusion:** Under the condition of ischemia and, expression of TGF- $\beta_1$  in parotid gland duct epithelial cells was increased each phase, but that of Bcl-2 was increased at early phase. Times of Perfusion may not be important factor which effects expression of TGF- $\beta_1$  in parotid gland duct epithelial cells. The expression of Bcl-2 in parotid gland duct epithelial cells may not be important factors which be responsible for the histological injures and repaired at ischemia reperfusion.

**Key words:** Rat, Parotid gland, duct epithelial cell, Ischemia reperfusion, TGF- $\beta_1$ , Bcl-2

缺血再灌注损伤是指组织缺血后恢复供血而引起的较为严重的组织损伤。再灌注时, 细胞的增殖抑制与细胞凋亡是导致细胞缺血再灌注损伤的重要因素。TGF- $\beta_1$ 具有多种生物学活性, 上皮细胞增殖抑制活性是其重要功能之一。Bcl-2具有抗凋亡作用, 属于原癌基因, 翻译成 Bcl-2 蛋白存在于胞体内, 通过抑制氧化-还原途径, 阻止细胞最后死亡, 进而抑制细胞凋亡。Sieg 等对实验性大鼠颌下腺缺血再灌注的形态学变化等方面进行了研究<sup>[1]</sup>。本实验采用免疫组化和一般形态学技术, 检测大鼠腮腺导管上皮细胞在不同再灌注时间、不同缺血时间

TGF- $\beta_1$  和 Bcl-2 的表达情况与形态学变化, 探讨 TGF- $\beta_1$ 、Bcl-2 在腮腺导管上皮细胞缺血再灌注损伤中所起的作用, 为腮腺缺血、损伤、修复和移植的研究提供理论和实验依据。

## 1 材料和方法

1.1 实验动物 健康清洁级成年 Wistar 大鼠 90 只, 体质量 250-300g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 实验动物生产许可证号 SCXK(京)2006-2009。动物购置后适应性饲养一周, 自由摄食饮水, 动物室温度 20℃~22℃, 湿度 50%~60%, 12 h 明暗交替。

1.2 动物分组: 大鼠随机分 9 组, 即: 缺血 0.5h, 分别再灌注 6h、12h、24h 三组; 缺血 1h, 分别再灌注 6h、12h、24h 三组; 假手术对照组术后 6h、12h、24h 三组, 每组 10 只。

1.2 缺血再灌注模型建立: 各组大鼠经腹腔注射戊巴比妥钠(1 mg / kg)麻醉。缺血再灌注实验组分离双侧颈总动脉, 并用银质动脉夹夹闭双侧颈总动脉, 0.5h 或 1h 后松开动脉夹, 分别再灌注 6h、12h、24h。对照组实施假手术, 即仅分离双侧颈总动脉, 但不阻断血流, 其它操作同实验组, 分别维持假手术状态 6h、12h、24h。

1.3 取材、制片与 HE 染色: 4%多聚甲醛灌注固定各组大鼠, 取出腮腺, 多聚甲醛后固定。梯度酒精脱水, 石蜡包埋, 连续切片, 每隔 20 张取 5 张片(一套), 共取 20 套。常规苏木精-伊红(HE)染色观察一般形态学变化。

1.4 免疫组化染色: 采用 SP 法检测 TGF- $\beta_1$ 、Bcl-2 的表达。经过微波抗原修复、1:100 浓度的兔抗 TGF- $\beta_1$ 、1:100 鼠抗 Bcl-2 一抗孵育, DAB 显色, 苏木素复染。每张切片随机选取 10 个高倍视野, 图像分析仪计数腮腺导管上皮细胞中的 TGF- $\beta_1$ 、Bcl-2 阳性细胞数。

1.5 统计学处理: 缺血再灌注组与对照组进行总体比较, 采用方差分析; 组内(缺血时间各组, 再灌注时间各组、对照各组)两两比较, 采用 q 检验。**检验水准  $\alpha=0.05$ (双侧)。**

## 2. 结果

2.1 TGF- $\beta_1$  表达免疫组化结果: TGF- $\beta_1$  在各组大鼠腮腺导管上皮细胞

中均有表达, 阳性颗粒呈桔黄色或棕色位于细胞核周围的胞浆内（见图 1、图 2、图 3）。方差分析显示缺血再灌注组较对照组 TGF-β<sub>1</sub> 表达明显提高（P<0.01），且随缺血时间的延长，TGF-β<sub>1</sub> 的表达呈逐渐增高趋势（P<0.01）；说明缺血再灌注使 TGF-β<sub>1</sub> 的表达明显升高；组间两两比较 q 检验结果，缺血时间 0.5h 与 1h 组有明显差异（P<0.01），说明再灌注时间一定，缺血时间影响 TGF-β<sub>1</sub> 表达，缺血时间越长，TGF-β<sub>1</sub> 表达上调越明显；组内比较再灌注 6h 与 12h 组、再灌注 12h 与 24h 组、6h 和 24h 组比较均无显著差异（见表 1），说明再灌注 6h、12h、24h 三个时间点的 TGF-β<sub>1</sub> 表达无差异，提示缺血时间一定，腮腺导管上皮 TGF-β<sub>1</sub> 表达不随再灌注时间延长而改变。。

表 1、缺血再灌注各组大鼠腮腺导管上皮细胞 TGF- β<sub>1</sub> 的表达  
（阳性细胞均数,  $\bar{x} \pm s$ ）

分组	n	再灌注 6h	再灌注 12h	再灌注 24h
对照组	10	17.25±2.98	17.34±1.29	17.38±1.34
缺血 0.5h	10	26.38±3.32**	24.42±2.65**	23.72±3.10**
缺血 1h	10	30.46±4.25**▲	29.82±3.12**▲	28.87±3.22**▲
		▲	▲	▲

注：与对照组比较，\*\*P<0.01；    与缺血 0.5h 组比较▲▲P<0.01 ；

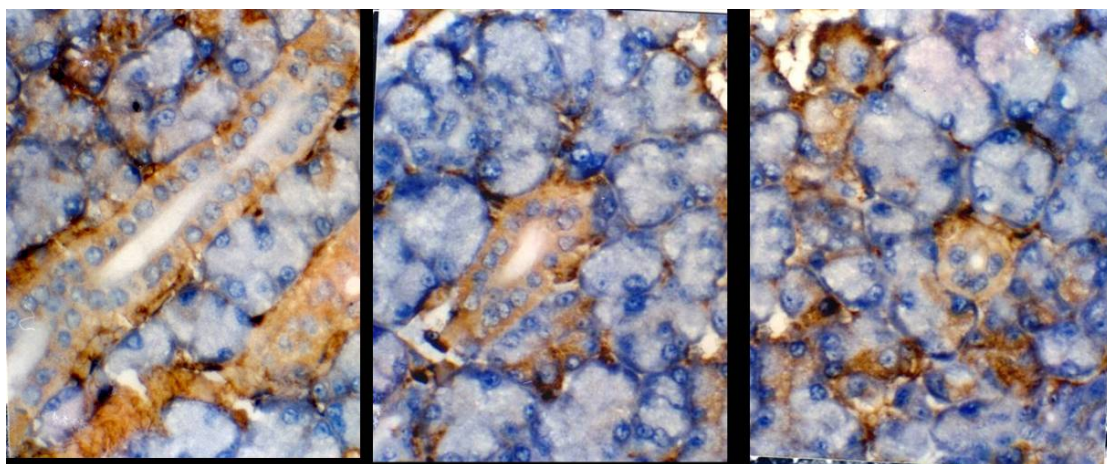


图1 缺血 1h 各组大鼠腮腺导管上皮细胞中 TGF- $\beta_1$  的表达 (SP $\times$ 400)  
左: 再灌注 6h , 中: 再灌注 12h, 右: 再灌注 24h

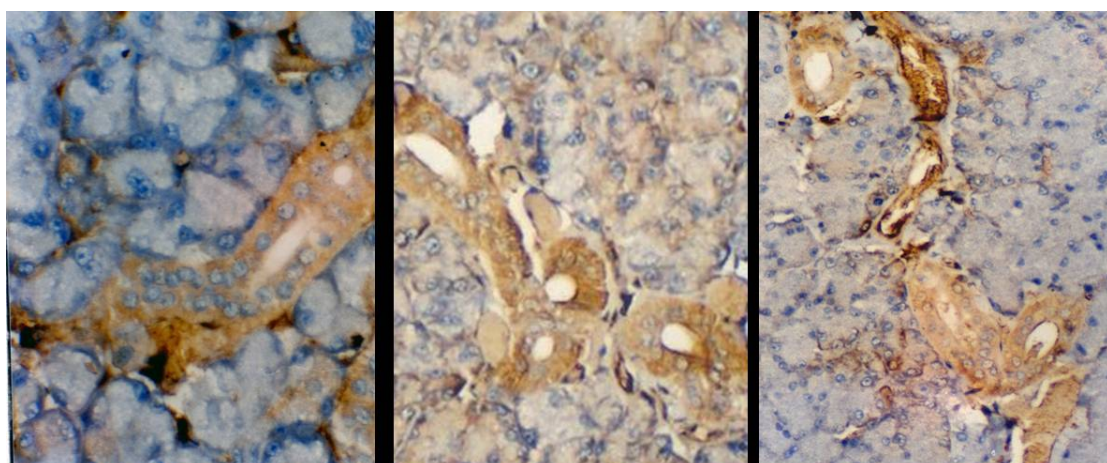
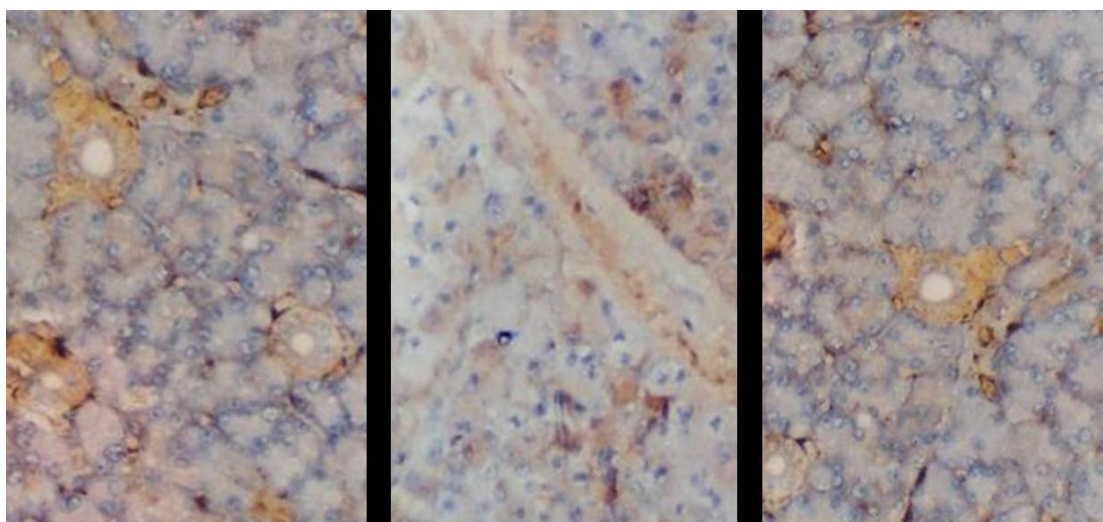


图2 缺血 0.5h 各组大鼠腮腺导管上皮细胞中 TGF- $\beta_1$  的表达 (SP $\times$ 400)  
左: 再灌注 6h , 中: 再灌注 12h, 右: 再灌注 24h



**图 3** 对照各组大鼠腮腺导管上皮细胞中 TGF- $\beta_1$  的表达 (SP $\times$ 400)  
左：假手术后 6h ， 中：假手术后 12h， 右：假手术后 24h

2.2 Bcl-2 表达免疫组化结果：Bcl-2 在导管上皮细胞中表达总体较少, 阳性颗粒呈桔黄色位于细胞核上方细胞浆内，如图 4、图 5 所示。各组阳性细胞数的比较见表 2。方差分析显示，再灌注 6h 的时间点上，缺血时间 0.5h 和 1h 组导管上皮细胞 Bcl-2 的表达均较对照组明显增高，有统计学意义 ( $P<0.05$ )，说明缺血再灌注使 Bcl-2 的表达在早期明显升高；再灌注 12h、24h 两个时间点，各组 TGF- $\beta_1$  的表达均较对照组无统计学意义 ( $P>0.05$ )，说明缺血再灌注对损伤中晚期 Bcl-2 的表达无明显影响。缺血 0.5h 与 1h 两个时点的 Bcl-2 表达均无差异，提示缺血时间不是影响大鼠腮腺导管上皮细胞 Bcl-2 表达的重要因素。

表 2、缺血再灌注各组大鼠腮腺导管上皮细胞 Bcl-2 的表达  
(阳性细胞均数  $\bar{x} \pm s$ )

分组	N	再灌注 6h	再灌注 12h	再灌注 24h
对照组	10	1.85 $\pm$ 0.28	1.91 $\pm$ 0.26	1.83 $\pm$ 0.43
缺血 0.5h	10	4.33 $\pm$ 0.32*	2.62 $\pm$ 0.53	2.12 $\pm$ 0.41
缺血 1h	10	4.76 $\pm$ 0.25*	2.42 $\pm$ 0.22	2.89 $\pm$ 0.43

注：与对照组比较，\* $P<0.05$ ；

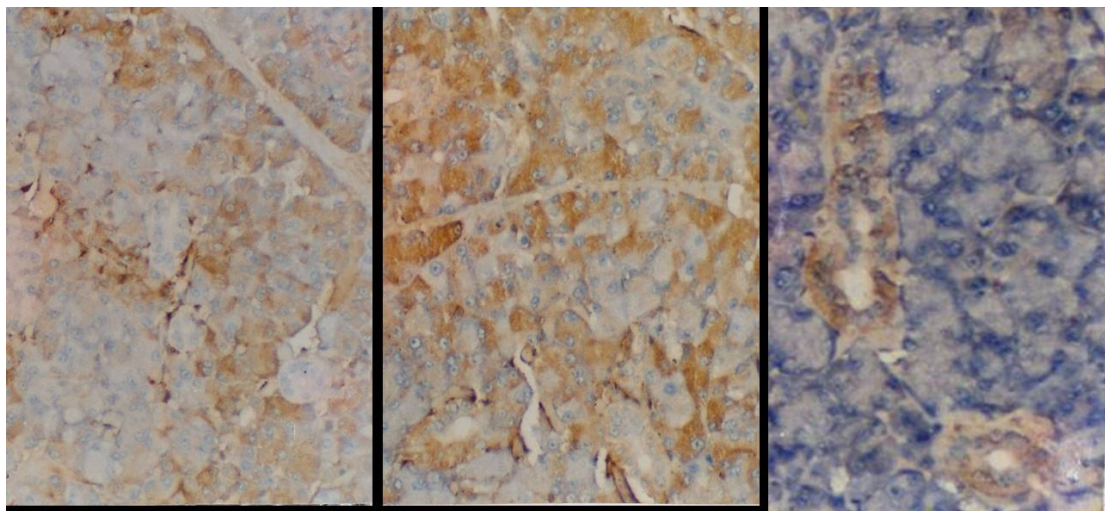


图4 再灌注 6h 各组大鼠腮腺导管上皮细胞中 Bcl-2 的表达 (SP×400)  
左: 对照组 , 中: 缺血 0.5h 组, 右: 缺血 1h 组

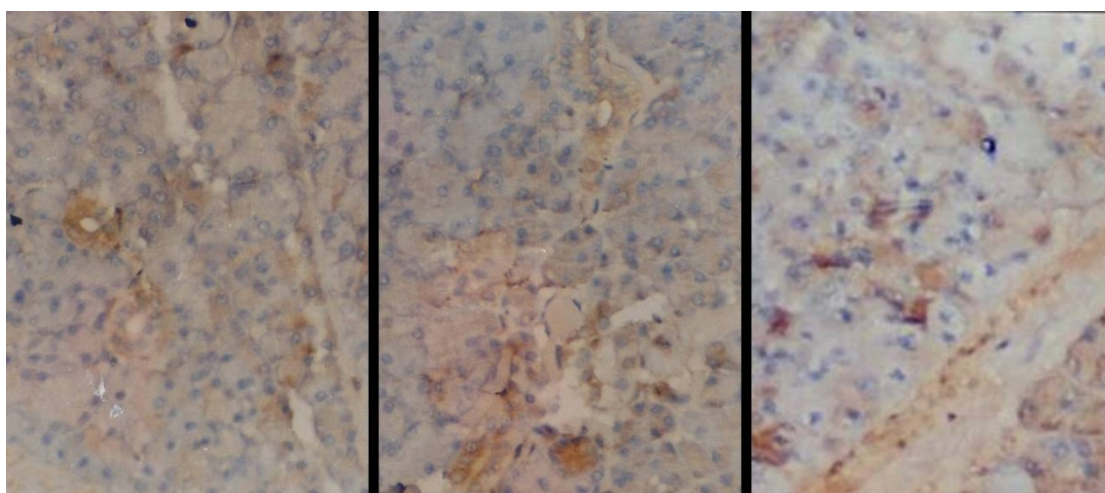


图5 再灌注 24h 各组大鼠腮腺导管上皮细胞中 Bcl-2 的表达 (SP×400)  
左: 对照组 , 中: 缺血 0.5h 组, 右: 缺血 1h 组

### 2.3 一般形态学结果

HE 染色可见 (图 6, 图 7): 对照组腮腺小叶结构清楚, 腺泡和导管上皮细胞核完整。再灌注 6h 腮腺小叶间隔疏松, 腺泡腺泡和导管上皮有不同程度出现核浓缩, 核碎裂现象, 即细胞核开始分裂为 2-4 个小体, 边集于核膜附近; 细胞核膜尚清楚。导管上皮细胞结构变化较腺泡细胞轻。再灌注 12h 各组, 上皮细胞的胞核变化更加明显, 导管上皮改变仍较轻。再灌注 24h 时, 腮腺组织细胞

结构开始出现修复，有核改变细胞减少。缺血 1h 组与 0.5h 组腮腺导管和腺泡上皮结构变化相似。

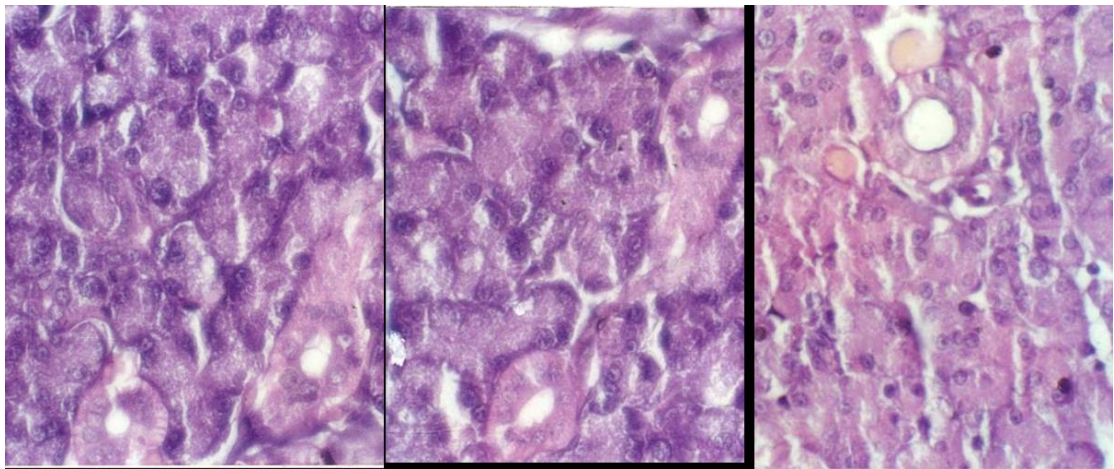


图 6 对照各组大鼠腮腺及导管上皮细胞形态学结构（HE×400）  
左：假手术后 6h ， 中：假手术后 12h，右：假手术后 24h

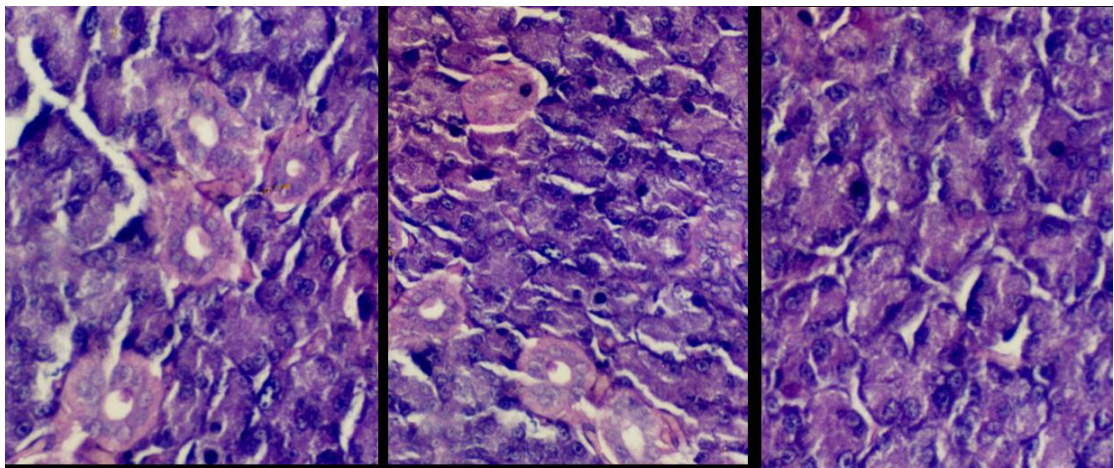


图 7 缺血 1h 各组大鼠腮腺及导管上皮细胞形态学结构（HE×400）  
左：再灌注 6h ， 中：再灌注 12h，右：再灌注 24h

3 讨论

TGF-β<sub>1</sub> 是广泛表达于多种正常细胞和转化细胞中的生长因子。以往多数学者认为它主要调节细胞的增殖、迁移和分化。一般认为，TGF-β<sub>1</sub> 通过诱导细胞内蛋白磷酸化及生长抑制基因表达, 来发挥上皮细胞的增殖抑制作用。近年国内有学者应用细胞培养技术发现，TGF-β<sub>1</sub> 可在体外诱导 TL-60 细胞发生凋亡【2】。缺血再灌注导致的细胞损伤中，炎症因子导致的细胞凋亡是其中主要形式【3】。本实验结果说明实验性缺血再灌注对大鼠腮腺导管细胞 TGF-β<sub>1</sub> 的表达有影响，缺血再灌注使 TGF-β<sub>1</sub> 的表达明显提高。结合 HE 染色形态学结果，腺

泡和导管上皮细胞程度不同地出现核浓缩、核碎裂、染色质边集等细胞凋亡形态学改变现象，提示上调的 TGF- $\beta_1$  可能促进腮腺细胞凋亡，同时抑制增殖。腮腺的形态学变化与 TGF- $\beta_1$  高表达密切相关。这一结果，与 Kishi K 的研究一致，他们发现，体外培养的成纤维细胞在缺氧条件下，TGF- $\beta_1$  的表达升高，进而发挥其细胞增殖抑制、诱导凋亡的作用【4】。本实验结果还显示，大鼠腮腺缺血再灌注损伤时，再灌注时间一定，TGF- $\beta_1$  的表达因缺血时间的延长呈逐渐增高；说明缺血时间影响 TGF- $\beta_1$  的表达，缺血时间越长，TGF- $\beta_1$  表达上调越明显；而缺血时间一定，再灌注 6h、12h、24h 三个时间点的 TGF- $\beta_1$  表达无差异，提示再灌注时间不是影响大鼠腮腺导管上皮细胞 TGF- $\beta_1$  表达的主要因素。

原癌基因 Bcl-2 是一种细胞凋亡抑制基因，可翻译成两种相似蛋白，表达在核膜、粗面内质网和线粒体膜上。本研究结果显示，缺血再灌注使 Bcl-2 的表达在损伤早期(6h)明显升高 Bcl-2；但再灌注 12h、24h 时，即缺血再灌注损伤中晚期，缺血再灌注对 Bcl-2 的表达无明显影响。Marzioni 等【5】研究发现，在胎盘损伤部位的绒毛细胞，Bcl-2 的表达明显高于其他正常部位，提示 Bcl-2 高表达可能起抑制凋亡发生、使损伤不致过度的作用，即一种组织保护功能。联系形态学结果，缺血再灌注早期组织细胞损伤明显，晚期逐渐修复，一致说明 Bcl-2 抑制损伤早期细胞凋亡的发生，对腮腺起保护作用，但并不能完全阻断凋亡发生。另一方面，缺血时间 0.5h 与 1h 组间比较 Bcl-2 的表达无显著差异 ( $P>0.05$ )，提示缺血时间不是影响大鼠腮腺导管上皮细胞 Bcl-2 表达的主要因素。至于缺血再灌注中后期时，Bcl-2 表达均与对照组无差别，说明此时它的凋亡抑制作用已达正常水平【7】，提示导管上皮细胞 Bcl-2 表达不是影响腮腺中期损伤和后期修复的主要因素，而由其他生长因子（如 TGF- $\beta_1$ ）发挥修复作用。

综上，缺血再灌注能影响 TGF- $\beta_1$ 、Bcl-2 在大鼠腮腺导管上皮细胞的表达；腮腺的形态学变化可能与上调的 TGF- $\beta_1$  表达密切相关。再灌注早期 Bcl-2 表达提高，可能起限制细胞凋亡的作用。一定范围内，随缺血时间延长，TGF- $\beta_1$  表达逐渐升高。

参考文献:

【1】 Sieg P, Geerling G, Kosmehl H, et al. Microvascular submandibular gland transfer for severe cases of keratoconjunctivitis sicca [J] . Plast Reconstr Surg,2000,106(3):554-560.

【2】 姚鲲，邢宏昶，王慧涵，等 TGF- $\beta_1$  诱导 TL-60 细胞凋亡及 TIEG1,Bcl-2/Bax 的表

达变化 [J] 现代肿瘤医学 2013,21 (1) 14-17

[3] 王永超, 高政 阿托伐他汀预处理对SD大鼠局部脑缺血再灌注损伤IL-1 $\beta$ 表达的影响 [J]. 实用预防医学2014 21 (5) : 618-620

[4] Kishi K, Nakajima H, Tajima S. Differential responses of collagen and glycosaminoglycan syntheses and cell proliferation to exogenous transforming growth factor beta 1 in the developing mouse skin fibroblasts inculture [J] . Br J Plast Surg, 1999, 52 ( 7) : 579 — 582.

[5] Colwell AS, Faudoa R, Krummel TM, et al. Transforming growth factor—beta, smad, and collagen expression patterns in fetal and adult keratinocytes [J]. Plast Reconstr Surg 2007,119 (3) :852-857

[6] Marziani D, Muhlhauser J, Crescimanno C, et al. Bcl-2 expression in the human placenta and its correlation with fibrin deposits[J]. Human Reprod, 1998, 13 (6) : 1717-1722

[7] 魏璇, 杜雪, 李咏梅, 等.VEGF-C 诱导宫颈癌 HeLa 细胞 Bcl-2、cyclin D1 的表达[J]. 实用预防医学, 2014, 21 (2) : 135-137