

Bax/Bcl-2、IFABP 及 D-D 在大鼠急性肠系膜上 静脉血栓形成后表达及意义

赵得银^{1,2} 刘 斌¹ 曹志新¹ 谢文涛¹ 司小毛¹ 方鲲鹏¹

摘要 目的 研究大鼠急性肠系膜上静脉血栓形成 (ASMVT) 后受累小肠在不同时间点的病理学改变及其细胞凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 的表达和相应时点血清肠脂肪酸结合蛋白 (IFABP) 及 D-二聚体 (D-D) 作为 ASMVT 后小肠病理改变及病情监测指标。方法 72 只成年雄性大鼠随机分为对照组、假手术组、实验组。于建模后 30 min、1、2、4 h 取病变肠段观察病理改变、检测细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 的表达,同时测血清 IFABP、D-D 值。结果 与对照组和假手术组比较,在各个时间点实验组大鼠检测肠 Bcl-2 和 Bax

表达均显著增加 ($P < 0.05$); Bax/Bcl-2 显著升高 ($P < 0.05$); 与对照组和假手术组比较,在各个时间点实验组大鼠血清 IFABP 和 D-D 浓度均显著升高 ($P < 0.05$),且随时间延长增加显著。结论 ASMVT 后受累小肠在不同时间点的病理学改变及 Bax/Bcl-2 的表达,结合相应时点血清 IFABP 及 D-D,可以诊断和监测 ASMVT 的病情。

关键词 Bcl-2; Bax; 肠脂肪酸结合蛋白; D-二聚体; 急性肠系膜上静脉血栓形成

中图分类号 R 572.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)04-0451-04

2013-12-20 接收

基金项目:安徽省教育厅自然科学基金(编号:2006KJ375B)

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院普通外科,合肥 230022

²宿州市立医院普通外科,宿州 234000

作者简介:赵得银,男,主治医师,硕士研究生;

刘 斌,男,副教授,副主任医师,硕士生导师,责任作者,

E-mail: anyiliubin@qq.com

急性肠系膜上静脉血栓形成 (acute superior mesenteric venous thrombosis, ASMVT) 是一种少见的急腹症,占整个肠缺血性疾病的 6%~9%^[1]。其病因复杂,临床表现缺乏特异性,早期诊断难,易被误诊和漏诊;目前临床上缺乏快速而准确的诊断及病

Effect of hypoxia preconditioning on the changes of HIF-1 α and VEGF in the brain tissue in rats with traumatic brain injury

Zhang Lei, Liu Jiachuan, Yang Yanyan, et al

(Dept of Neurosurgery, The Clinical College of PLA Affiliated Anhui Medical University,
The 105th Hospital of PLA Hefei 230031)

Abstract Objective To observe hypoxic preconditioning on traumatic brain injury (TBI) in rat brain tissue of contusion area of hypoxia inducible factor-1 and vascular endothelial growth factor expression affect and to investigate hypoxic preconditioning on brain injury protection mechanism. **Methods** 102 SD rats were randomly divided into control group (Con, $n = 6$), traumatic brain injury group (TBI, $n = 48$) and hypoxic preconditioning group (HPC, $n = 48$). HPC group of rats were firstly placed in a hypobaric chamber for hypoxic preconditioning (50.47 kPa, 3 d, 3 h/d). Subsequently HPC group and TBI group were established rat model of traumatic brain injury by adopting improved feeney free fall. RT-PCR and Western blot were used to detect the changes of HIF-1 α and VEGF in each group of brain of contusion area on the 1, 4, 8, 12 h and 1, 3, 7, 14 d after injury. **Results** Compared with the control group, the expressions of HIF-1 α in the TBI group significantly increased at 4, 8, 12 h and 1, 3 d ($P < 0.05$). At the same time, the expressions of VEGF in the TBI group were higher than those in the control group 4, 8, 12 h and 1, 3, 7 d after injury ($P < 0.05$). Compared with TBI group, the expression levels of HIF-1 α and VEGF increased at 1 h in the HPC group, and increased significantly at 4, 8, 12 h and 1, 3 d until maintained 7 d after injury ($P < 0.05$). **Conclusion** Hypoxic preconditioning can improve the traumatic brain injury of hypoxia tolerance, induce the activation of vascular endothelial growth factor, and thus play a role of early brain protection, and its mechanism may be related to HIF-1 α and VEGF expression up-regulation.

Key words hypoxic preconditioning; traumatic brain injury; HIF-1 α ; VEGF; rat; brain tissue

情判断指标。该研究试图通过分析大鼠 ASMVT 后受累小肠在不同时间点的病理学改变及其细胞凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 的表达,结合检测相应时点血清肠脂肪酸结合蛋白(intestinal fatty acid binding protein,IFABP)及 D-二聚体(D-dimer,D-D)浓度,探讨 ASMVT 后不同时间小肠病理改变及监测指标。

1 材料与方法

1.1 实验动物 清洁级 SD 雄性大鼠 72 只,体重 365~450(405±18)g,由安徽医科大学实验动物中心提供。

1.2 主要药品、试剂与仪器 IFABP 酶联反应试剂盒、Bcl-2、Bax 一抗、SABC 免疫组化染色试剂盒、DAB 显色试剂盒均购于武汉博士德生物有限公司。

1.3 方法

1.3.1 动物分组与模型制备 72 只 SD 大鼠随机分成对照组、假手术组、实验组,每组 24 只。各组内再随机分成建模后 30 min 组、建模后 1 h 组、建模后 2 h 组、建模后 4 h 组,每组 6 只。所有大鼠术前禁食 12 h,不禁水,称重后 10% 水合氯醛(0.3 ml/100 mg)腹腔注射麻醉。备皮后固定于手术台,术野 75% 乙醇溶液消毒,腹部正中中线开腹。对照组,仅在各相应时间点采血及切取肠组织。假手术组,仅麻醉后开腹显露肠系膜上静脉主干。实验组,采取扎闭肠系膜上静脉主干方法建立急性肠系膜上静脉血栓的模型^[2-3]。各组大鼠于相应时间点采集血液样本及切取病变肠段的肠管,对照组及假手术组切取与实验组大鼠相应的肠段。

1.3.2 血清 IFABP 及 D-D 测定 分别于实验组建模后 30 min、1、2、4 h 各个时间点对各组大鼠抽取血液样本,所有血样本用离心机离心 10 min(3 000 r/min)取上清液。D-D 检测立即送检,应用全自动凝血分析仪测定。血清 IFABP 样本于离心后取血清 -80 °C 保存,1 周内检测。

1.3.3 病理形态学观察 各组所有大鼠采集血样本后立即切取病变肠段(回肠段约 5 cm),清洗肠腔后 10% 福尔马林固定(对照组和假手术组取与实验

组病变肠段相应的肠段)。脱水后石蜡包埋,切片厚度为 3 μm。常规 HE 染色后,在 40 倍显微镜下观察回肠病理形态学改变。

1.3.4 免疫组化法检测 Bcl-2、Bax 表达 采用链酶亲和素-生物素-复合物法(SABC 三步法)检测,具体操作严格按试剂盒说明书进行。用已知阳性标本作为阳性对照,以 PBS 代替一抗作为阴性对照,阳性反应为细胞质呈棕褐色。各时间点从每组随意选取 6 张切片,每张切片在高倍显微镜下任意选择 3 个视野进行图像分析。图像分析采用 Image-Pro Plus 6.0 分析测量图像软件,分别测定 Bcl-2 和 Bax 的平均吸光度值,以平均吸光度作为 Bax、Bcl-2 基因蛋白表达水平的半定量参数。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间两两比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 肠管切片常规 HE 染色观察 对照组大鼠肠壁全层细胞形态正常,结构清楚。假手术组部分大鼠肠黏膜上皮细胞轻度水肿,无明显黏膜脱落,实验组大鼠建模后 30 min 即可见肠黏膜层淤血,腺体扩张,少量黏膜破坏、脱落,肠系膜静脉淤血扩张,未见明显血栓。建模后 1 h 可见肠绒毛排列紊乱,部分脱落,腺体扩张,绒毛及腺体周围少量出血,系膜血管内仍未见明显血栓形成。建模后 2 h,肠黏膜上皮破坏进一步加重,脱落明显,绒毛及腺体周围出血增加,少部分大鼠小肠系膜血管内可见血栓形成。建模后 4 h,大鼠肠管扩张变薄,肠黏膜上皮脱落明显,正常绒毛结构少见,腺体破坏、减少,黏膜层及黏膜下层亦可见明显出血,部分肌层坏死明显,甚至全层坏死,系膜血管内可见血栓形成。

2.2 免疫组化法检测 Bax、Bcl-2 的表达情况 在各个时间点,与对照组及假手术组比较,实验组大鼠肠管 Bax、Bcl-2 表达均明显升高($P < 0.05$),假手术组则较对照组略有升高,但差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1、图 1。

表 1 对照组、假手术组、实验组大鼠肠 Bcl-2、Bax 表达情况比较($n = 24, \bar{x} \pm s$)

组别	建模后 30 min			建模后 1 h			建模后 2 h			建模后 4 h		
	Bax	Bcl-2	Bax/Bcl-2									
对照	0.075 ± 0.007	0.198 ± 0.033	0.379	0.085 ± 0.011	0.175 ± 0.043	0.486	0.080 ± 0.010	0.184 ± 0.035	0.435	0.077 ± 0.011	0.192 ± 0.035	0.401
假手术	0.084 ± 0.009	0.196 ± 0.030	0.429	0.087 ± 0.012	0.203 ± 0.031	0.429	0.085 ± 0.012	0.207 ± 0.026	0.411	0.086 ± 0.015	0.195 ± 0.028	0.441
实验	0.285 ± 0.038* #	0.473 ± 0.062* #	0.603* #	0.331 ± 0.039* #	0.451 ± 0.066* #	0.734* #	0.389 ± 0.060* #	0.396 ± 0.064* #	0.982* #	0.218 ± 0.050* #	0.248 ± 0.048* #	0.879* #

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与假手术组比较: # $P < 0.05$

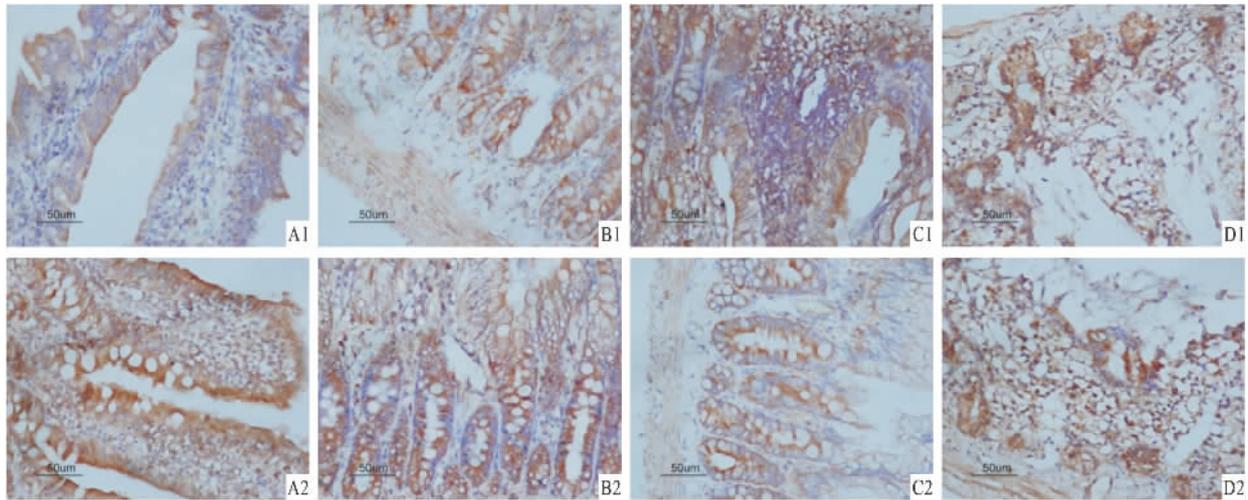


图1 实验组大鼠各个时间点回肠 Bax、Bcl-2 蛋白表达情况 DAB×400

1: Bax 蛋白; 2: Bcl-2 蛋白; A: 建模后 30 min; B: 建模后 1 h; C: 建模后 2 h; D: 建模后 4 h

2.3 血清 IFABP 检测 对建模后 30 min、1、2、4 h 4 个时间点对照组、假手术组和实验组组间分别比较,实验组大鼠血清 IFABP 较对照组和假手术组均显著增加($P < 0.05$),假手术组较对照组略有变化,但差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 2。

表 2 各组大鼠血清 IFABP 值比较($n = 24$, $\mu\text{g/ml}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	建模后 30 min	建模后 1 h	建模后 2 h	建模后 4 h
对照	29.59 ± 5.25	29.23 ± 4.61	27.71 ± 4.75	28.33 ± 4.41
假手术	31.74 ± 5.48	33.49 ± 5.64	30.10 ± 6.03	32.81 ± 6.47
实验	130.73 ± 11.97* #	296.14 ± 31.68* #	378.33 ± 35.99* #	523.35 ± 32.73* #

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与假手术组比较: # $P < 0.05$

2.4 血清 D-D 检测 对建模后 30 min、1、2、4 h 4 个时间点对照组、假手术组和实验组组间分别比较,实验组大鼠血清 D-D 较对照组和假手术组均显著增加($P < 0.05$),假手术组较对照组略有变化,但差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 3。

表 3 各组大鼠血清 D-D 值比较($n = 24$, $\mu\text{g/L}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	建模后 30 min	建模后 1 h	建模后 2 h	建模后 4 h
对照	0.30 ± 0.09	0.35 ± 0.10	0.33 ± 0.10	0.32 ± 0.12
假手术	0.33 ± 0.12	0.35 ± 0.10	0.37 ± 0.12	0.40 ± 0.13
实验	1.07 ± 0.31* #	1.12 ± 0.32* #	1.31 ± 0.31* #	1.67 ± 0.26* #

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与假手术组比较: # $P < 0.05$

3 讨论

ASMVT 后肠道会发生淤血及缺血性改变^[2,4],缺血可导致肠黏膜水肿、充血,进一步发展可出现黏

膜出血、坏死及脱落,严重情况下可出现肠壁坏死、肠腔出血,整个过程都有细胞凋亡参与。通过检测大鼠 ASMVT 后肠组织细胞凋亡相关蛋白,可以反映大鼠肠管缺血情况。Bcl-2/Bax 的比值决定着细胞在受到凋亡刺激后的生存与凋亡^[5-6]。Bcl-2 蛋白表达下调,Bax 蛋白过量表达,Bcl-2/Bax 下降则促进细胞凋亡,否则反之。本研究显示 Bax、Bcl-2 在对照组大鼠肠管组织呈低表达,假手术组较对照组表达变化不明显;实验组大鼠在结扎肠系膜上静脉后 30 min、1、2 h,Bax、Bcl-2 表达较对照组及假手术组明显升高,Bcl-2 随着时间延长表达呈下降趋势,Bax/Bcl-2 比值则明显升高,说明大鼠肠上皮细胞向着凋亡方向发展。建模后 4 h,Bax、Bcl-2 表达均较之前明显下降,分析原因可能为肠系膜上静脉结扎后 4 h 大鼠肠管明显坏死,黏膜脱落,腺体变少,肌层出血坏死,肠管扩张变薄有关,因此虽然实际细胞凋亡增加,但免疫组化检测值下降。

IFABP 在正常人群的血液和尿液中难于检出,而小肠缺血早期患者的血清和尿液中 IFABP 升高,特别是肠系膜梗死患者升高更为显著。Kanda et al^[7] 研究认为几乎所有急腹症患者都会出现 IFABP 升高,但是小肠缺血性疾病明显高于非缺血性疾病。本研究中在各个相应时间点实验组大鼠血清 IFABP 浓度比对照组和假手术组均明显升高,且随时间延长持续增加。说明大鼠肠淤血及缺血后 IFABP 释放增加且病变程度越重,其在血清中浓度越高。提示 IFABP 在 ASMVT 疾病时,早期血清即有明显变化,且检测值越高提示病变严重程度越高。

D-D 是纤维蛋白降解后一种特异性终产物,可以反映体内凝血和纤溶的变化过程,对血栓性疾病的诊断有重要意义^[8]。其异常增高与血栓疾病,如肺栓塞、深静脉血栓形成、弥漫性血管内凝血等关系已有较多的研究,临床上常用于静脉血栓的排除性诊断。Altinyollar et al^[9]进行动物研究提示血浆 D-D 可作为早期诊断急性肠系膜缺血标志物。有研究^[10]显示肠系膜静脉血栓性疾病者血浆 D-D 均明显高于正常值。本研究进一步证实对照组大鼠 D-D 值均处于低水平,假手术组大鼠 D-D 值随开腹时间延长略有升高,但差异无统计学意义。实验组 D-D 随时间延长有明显升高,且随时间延长浓度持续升高。因此,本研究提示 D-D 值变化能反映大鼠体内血栓形成及严重程度、发展变化趋势。

综上所述,本研究通过结扎法建立大鼠 ASMVT 模型,研究受累肠管细胞凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 的表达,结合相应时间点血清 IFABP、D-D 指标,对 ASMVT 的及早诊断及受累肠管的病理改变程度的判断有一定的临床借鉴意义。

参考文献

- [1] Singal A K, Kamath P S, Tefferi A. Mesenteric venous thrombosis [J]. *Mayo Clin Proc* 2013 88(3): 285-94.
[2] 陈建立. 肠系膜上静脉血栓形成的实验及临床研究[D]. 天

津医科大学 2012.

- [3] Somma F, Berritto D, Iacobellis F, et al. 7T muMRI of mesenteric venous ischemia in a rat model: timing of the appearance of findings [J]. *Magn Reson Imaging* 2013 31(3): 408-13.
[4] 王攀, 杨强, 赵渝. 兔急性肠系膜上静脉血栓形成模型建立及其病理学观察 [J]. *四川动物* 2011 30(4): 624-8.
[5] Chang G, Zhang P, Ye L, et al. Protective effects of sitagliptin on myocardial injury and cardiac function in an ischemia/reperfusion rat model [J]. *Eur J Pharmacol* 2013 718(1-3): 105-13.
[6] Yang H, Meng Z, Zhang C, et al. Establishing a new rat model of central venous sinus thrombosis and analyzing its pathophysiological and apoptotic changes [J]. *J Neurosci Methods* 2012 203(1): 130-5.
[7] Kanda T, Tsukahara A, Ueki K, et al. Diagnosis of ischemic small bowel disease by measurement of serum intestinal fatty acid-binding protein in patients with acute abdomen: a multicenter, observer-blinded validation study [J]. *J Gastroenterol* 2011 46(4): 492-500.
[8] 余鑫, 余昌俊, 余康敏, 等. CD62_P、CD63、D-二聚体与下肢深静脉血栓形成的关系 [J]. *安徽医科大学学报* 2011 46(4): 379-81.
[9] Altinyollar H, Boyabatli M, Berberoglu U. D-dimer as a marker for early diagnosis of acute mesenteric ischemia [J]. *Thromb Res* 2006 117(4): 463-7.
[10] Nomura H, Wada H, Mizuno T, et al. Negative predictive value of D-dimer for diagnosis of venous thromboembolism [J]. *Int J Hematol* 2008 87(3): 250-5.

The expression and significance of Bax/Bcl-2, IFABP and D-dimer after acute superior mesenteric venous thrombosis in rats

Zhao Deyin^{1,2}, Liu Bin¹, Cao Zhixin¹, et al

(¹Dept of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Dept of General Surgery, The Suzhou Municipal Hospital, Suzhou 234000)

Abstract Objective To study the significance of pathological changes and expression of apoptosis-related proteins Bax/Bcl-2, combined with the values of serum intestinal fatty acid binding protein (IFABP) and D-dimer (D-D) in different time after acute superior mesenteric venous thrombosis (ASMVT) in rats. **Methods** 72 SD adult male rats were randomly divided into control group, sham-operation group and model group. The small intestine was cut partly to observe pathological changes and detect the expression of apoptosis-related proteins Bcl-2 and Bax after modeling for 30 minutes, 1, 2, 4 hours, respectively; meanwhile, IFABP and D-D serum values were also detected respectively. **Results** In model group, the expression of Bcl-2 and Bax was significantly increased ($P < 0.05$); Bax/Bcl-2 increased significantly ($P < 0.05$); the concentration of serum IFABP and D-D was significantly higher ($P < 0.05$). **Conclusion** The study suggests that pathological changes and the expression of Bax/Bcl-2 in intestinal combined with the serum IFABP and D-D after ASMVT can be used to diagnose and monitor ASMVT.

Key words Bcl-2; Bax; intestinal fatty acid binding protein; D-dimer; acute superior mesenteric venous thrombosis