

# 雌激素对大鼠肾上腺皮质中 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响

阿依木古丽<sup>①</sup> 蔡勇<sup>②</sup> 范光丽<sup>③</sup> 曾宪成<sup>④</sup> 魏锁成<sup>①</sup> 李倬<sup>①</sup>

(<sup>①</sup>西北民族大学生命科学与工程学院 兰州 730030 ;<sup>②</sup>西北民族大学理科实验中心 兰州 730030

<sup>③</sup>西北农林科技大学动物科技学院 杨凌 712100 ;<sup>④</sup>中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所 兰州 730050)

**摘要** 利用免疫组织化学 SP 法检测摘除卵巢及补充 17 $\beta$ -雌二醇后大鼠肾上腺皮质各层 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的变化。结果表明,摘除卵巢后肾上腺皮质束状带和网状带 Bcl-2 和 Bax 表达都增加,球状带中 Bax 表达增加,而 Bcl-2 表达阴性。补充 17 $\beta$ -雌二醇后,束状带和网状带中 Bcl-2 蛋白表达显著降低,Bax 在束状带中表达极显著降低,而在网状带中没有阳性产物,在球状带中 Bcl-2 表达上升,而 Bax 表达下降。表明雌激素在肾上腺皮质各层发挥着复杂的作用。

**关键词**:肾上腺皮质,雌激素,Bcl-2,Bax,免疫组织化学

中图分类号:Q955 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2006)03-114-04

## Effects of Estrogen on Bcl-2 and Bax Expression in Rat Adrenal Cortex

Ayimuguli<sup>①</sup> CAI Yong<sup>②</sup> FAN Guang-Li<sup>③</sup> ZENG Xian-Cheng<sup>④</sup> WEI Suo-Cheng<sup>①</sup> LI Zhuo<sup>①</sup>

(<sup>①</sup>Life Science and Engineering College of Northwest Minorities University, Lanzhou 730030 ;

<sup>②</sup>Science Experiment Center of Northwest Minorities University, Lanzhou 730030 ;

<sup>③</sup>College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling 712100 ;

<sup>④</sup>Lanzhou Institute of Animal Science and Veterinary Pharmaceutics, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730050, China)

**Abstract** Immunohistochemical SP method was used to detect the expression of Bcl-2 and Bax in the adrenal cortex of rat after ovariectomized and treated with 17- $\beta$ -estradiol. After ovariectomy, the expression of both Bcl-2 and Bax was increased in zona fasciculata and zona reticularis, the expression of Bax was increased but expression of Bcl-2 was negative in zona glomerulosa. After treated with 17- $\beta$ -estradiol, the expression of Bcl-2 was decreased in zona fasciculata and zona reticularis, while the expression of Bax was significantly decreased in zona fasciculata and negative expression of Bax was found in zona reticularis; in zona glomerulosa, the expression of Bcl-2 was increased and that of Bax was decreased after treated with 17- $\beta$ -estradiol. All the results suggest that estrogen have different complicated effects on different zona of adrenal cortex.

**Key words**: Adrenal cortex, Estrogen, Bcl-2, Bax, Immunohistochemistry

随着更年期的到来,女性卵巢功能衰退引起卵巢分泌雌激素减少,使全身各系统的功能都受到影响,同时引起肾上腺结构和功能发生变化<sup>[1]</sup>。刘慧娟等<sup>[2]</sup>研究发现,切除大鼠双侧卵巢可引起肾上腺皮质网状带代偿性增厚,细胞增生,分泌功能增强。Dong 等<sup>[3]</sup>发现,Bcl-2 在其基因增强子区有雌激素反应元件(ERE<sub>s</sub>)

序列,雌激素可促进 Bcl-2 的表达,而抑制细胞的凋亡。有关雌激素促进 Bcl-2 蛋白表达的研究报道较多,但大多集中在脑缺血区<sup>[4]</sup>、子宫内

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No.39670550);

第一作者介绍 阿依木古丽,女,主要从事动物形态学及神经生物学研究, E-mail: jimul...@163.com。

收稿日期:2005-09-03,修回日期:2006-02-17

膜<sup>[5]</sup>、心内神经节<sup>[6]</sup>等区,尚未见到有关肾上腺中 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的报道。为了探讨雌激素对肾上腺皮质的作用机制,本文进行了雌激素对肾上腺皮质各层中 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达影响的研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物分组与动物模型的建立

健康雌性 SD 大鼠(第四军医大学实验动物中心提供)共 30 只,3 月龄,体重 210~240 g。随机分为 3 组:第一组假手术组(C 组);第二组卵巢摘除组(OVX 组);第三组卵巢摘除并用 17 $\beta$ -雌二醇(E<sub>2</sub>)治疗组(OVX+E<sub>2</sub>组)。每组各 10 只,采用 10%水合氯醛腹腔麻醉大鼠,C 组做假手术,OVX 和 OVX+E<sub>2</sub>组摘除双侧卵巢,手术 1 周后,OVX+E<sub>2</sub>组,隔天皮下注射 17 $\beta$ -雌二醇 10  $\mu$ g/只(Sigma 公司产品,溶于无水乙醇,注射剂量参照 Suresh 等人的实验结果<sup>[7]</sup>),C 组和 OVX 组皮下注射等量无水乙醇,连续 4 周。

### 1.2 标本采集及组织切片

末次注射 17 $\beta$ -雌二醇后 24 h,各组大鼠 10%水合氯醛腹腔麻醉,经主动脉灌注固定,取肾上腺,于相同的固定液中后固定 4~8 h,浸入 4 $^{\circ}$ C 20%蔗糖 PB 液(pH = 7.4)中,直至组织沉淀,将组织于开放式冰冻切片连续冠状切片,切片厚 35  $\mu$ m。

### 1.3 免疫组化 SP 法检测 Bcl-2 和 Bax 的表达

免疫组化染色程序按照 SP 试剂盒(福州迈新生物公司产品)说明进行,第一抗体(武汉博士德公司产品)Bcl-2、Bax 多克隆抗体工作浓度分别为 1:150 和 1:200。同时设阴性对照组,用 0.01 mol/L PBS 代替第一抗体,其余步骤相同。硫酸镍胶增强的 DAB 蓝色体系呈色,贴片,晾干,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,显微镜观察。阳性产物呈深蓝色或蓝色,阴性对照组无阳性产物。

### 1.4 统计学处理

每组免疫组化染色切片随机选取 5 个不同部位,用 Motic 数码显微镜拍照,江苏捷达 801 形态分析软件对阳性细胞进行分析,测量阳性产物灰度值,用均数  $\pm$  标准差( $\bar{X} \pm S$ )表示,t-检验统计学处理。

## 2 结果

### 2.1 束状带中 Bcl-2 和 Bax 的表达

对各组大鼠肾上腺皮质束状带 Bcl-2 和 Bax 表达阳性产物灰度值进行统计,结果如表 1 所示。C 组中, Bcl-2 和 Bax 表达较少,染色较浅, Bcl-2 在细胞束间的毛细血管内皮有少量表达(图版 I:1); OVX 组中 Bcl-2 表达增多,但差异无显著性; Bax 表达较 C 组显著增加( $P < 0.05$ ),染色深,在细胞束间的毛细血管内皮分布有深染的阳性产物(图版 I:2),在补充外源性雌二醇之后 Bcl-2 表达显著减少( $P < 0.05$ )(图版 I:3),Bax 表达极显著减少( $P < 0.01$ )。

表 1 雌激素对大鼠肾上腺皮质束状带 Bcl-2 及 Bax 表达的影响( $\bar{X} \pm S$ )

组别	Bcl-2 灰度值	Bax 灰度值
假手术(C)	96.678 6 $\pm$ 10.442 2	101.448 8 $\pm$ 21.786 6*
手术(OVX)	87.692 2 $\pm$ 3.496 7	68.049 1 $\pm$ 11.432 6
手术+E <sub>2</sub> (OVX+E <sub>2</sub> )	106.837 7 $\pm$ 9.850 3*	96.492 4 $\pm$ 9.674 4**

与 OVX 组相比 \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

### 2.2 网状带中 Bcl-2 和 Bax 的表达

对各组大鼠肾上腺皮质束状带 Bcl-2 和 Bax 表达阳性产物灰度值进行统计,结果如表 2 所示。C 组中 Bcl-2 和 Bax 都有多量分布,染色都较束状带深,OVX 组中两者表达都显著增加( $P < 0.05$ ),染色深(图版 I:4,5);补充外源性雌二醇后, Bcl-2 表达极显著减少( $P < 0.01$ ),Bax 无阳性产物。

表 2 雌激素对大鼠肾上腺皮质网状带 Bcl-2 及 Bax 表达的影响( $\bar{X} \pm S$ )

组别	Bcl-2 灰度值	Bax 灰度值
假手术(C)	86.675 6 $\pm$ 14.306 7*	83.343 7 $\pm$ 8.943 2*
手术(OVX)	66.579 7 $\pm$ 9.808 8	63.329 9 $\pm$ 15.104 8
手术+E <sub>2</sub> (OVX+E <sub>2</sub> )	107.095 4 $\pm$ 19.014 0*	-

与 OVX 组相比 \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; - 表示阴性。

在球状带,C 组中 Bcl-2 和 Bax 都弱阳性表达(图版 I:6)。OVX 组中 Bax 强阳性表达,而 Bcl-2 没有阳性产物,补充雌二醇后 Bcl-2 和 Bax

都弱阳性表达,基本恢复正常水平。

### 3 讨论

大量研究表明,性腺对肾上腺功能发挥有重要的意义。Enzio Muller R<sup>[8]</sup>等人研究发现,在雄性大鼠,去势引起肾上腺束状带和网状带细胞增生。吴波<sup>[9]</sup>等发现,在雌性大鼠,切除双侧卵巢使肾上腺萎缩。最新研究发现,去卵巢使大鼠肾上腺皮质总厚度和束状带厚度均呈萎缩性变化,束状带细胞交叉成网,失去平行排列及与被膜垂直的结构特征<sup>[10]</sup>,而肾上腺网状带细胞代偿性肥大,网状带增厚<sup>[11]</sup>。伴随这些解剖学变化,肾上腺发生功能变化。

Bcl-2 和 Bax 是与凋亡密切相关的蛋白质,其作用是相互拮抗的<sup>[12]</sup>,他们通过蛋白-蛋白的相互结合与解聚作用主宰着细胞的存活与凋亡。当 Bcl-2 大量表达时,形成 Bcl-2 同源二聚体,细胞受到保护;当 Bax 大量表达时,形成 Bax 同源二聚体,细胞趋向凋亡。

本实验发现,雌激素在肾上腺皮质各层发挥着不同作用。在束状带摘除卵巢后 Bax 表达显著增加,而 Bcl-2 的变化无显著性差异。Bax 作为一种促凋亡蛋白,其表达增多说明细胞趋向凋亡。推测雌激素通过下调 Bax 表达从而保护束状带细胞,影响其分泌功能。网状带细胞主要分泌雄激素,同时分泌少量的雌激素。在此区,雌激素对 Bcl-2 和 Bax 都具有下调作用,而且对其下调作用均无显著性差异。细胞对凋亡信号的敏感性主要决定于 Bcl-2 和 Bax 之间的比例。表明了雌激素能维持网状带细胞 Bcl-2 和 Bax 之间的相对平衡,从而维持网状带细胞功能的发挥。而在球状带,雌激素通过下调 Bax 表达的同时上调 Bcl-2 表达,从而保护球状带细胞免受凋亡。

假手术组中,束状带细胞束间毛细血管内皮有 Bcl-2 表达,说明 Bcl-2 是维持此区血液供

应所必需。摘除卵巢后,Bax 在细胞束间的毛细血管内皮出现了强阳性反应产物,推测血管内皮细胞趋向凋亡,减少肾上腺血液供应,加速凋亡的发生。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Lisa Chong, Heather McDonald, Evelyn Strauss. Deconstructing age. *Science*, 2004, **305**( 5 689 ): 1 419 ~ 1 426.
- [ 2 ] 刘慧娟,贾德永,刘凯等.去卵巢对大鼠肾上腺皮质网状带结构的影响.新乡医学院学报,2005, **4**( 22 ): 313 ~ 317.
- [ 3 ] Dong L, Wang W. Mechanisms of transcriptional activation of Bcl-2 gene expression by 17 beta-estradiol in breast cancer cells. *J Biol Chem*, 1999, **274**( 45 ): 32 099.
- [ 4 ] 杨卫民,周农,汪凯等.雌激素对雄性大鼠缺血性脑损伤的神经保护作用及其可能机制.临床神经病学杂志, 2005, **18**( 4 ) 250 ~ 253.
- [ 5 ] 徐霞,刘美莲,卢瑾等.长期雌激素替代治疗对大鼠子宫内膜 Bcl-2 和 H-ras 基因与蛋白表达的影响.中南大学学报(医学版) 2005, **30**( 1 ) 41 ~ 45.
- [ 6 ] 陈小武,祝善乐,范玉华等.雌激素对卵巢摘除大鼠内心神经节细胞 Bcl-2 和 Bax 表达的影响.神经解剖学杂志, 2004, **20**( 5 ) 509 ~ 512.
- [ 7 ] Suresh B P, Jenny M J, Robert D K. Treatment of rats with 17 $\beta$ -estradiol or relaxin rapidly inhibits uterine estrogen receptor  $\beta$ 1 and  $\beta$ 2 messenger ribonucleic acid levels. *Biology of Reproduction*, 2002, **67**: 1 919 ~ 1 926.
- [ 8 ] Enzio Muller R, Herbert H. Wotiz. Estrogen-binding protein in mouse and rat adrenal glands. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, **267**( 253 ): 740 ~ 745.
- [ 9 ] 吴波,徐冰,黄添友等.去卵巢大鼠骨代谢变化与雌激素替代治疗效果.中国药理学通报,1997, **13**( 2 ): 163 ~ 166.
- [ 10 ] 沈晓明,杜元灏,李谈.调神益肾针对更年期大鼠雌激素分泌器官的干预作用.中医药学刊,2002, **20**( 3 ): 336 ~ 355.
- [ 11 ] 周运富,尹保国,刘克荣等.切除大鼠卵巢对肾上腺皮质束状带和网状带的影响.第一军医大学分校学报, 2003, **26**( 2 ) 93.
- [ 12 ] 哈灵侠,张绍芬,谢倩等.更年期大鼠血清雌二醇水平与脾细胞凋亡的增龄性改变.复旦学报(医学版),2004, **31**( 2 ): 155 ~ 157.

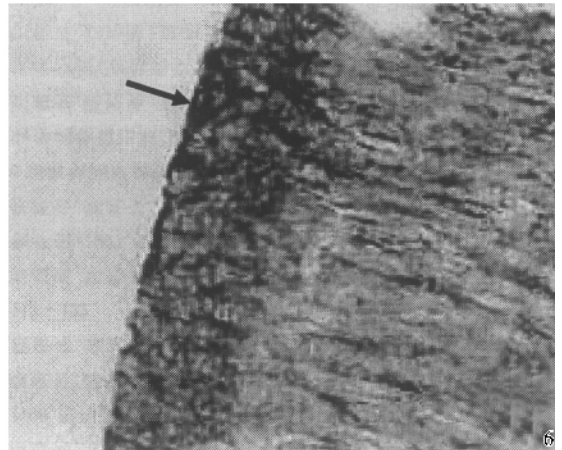
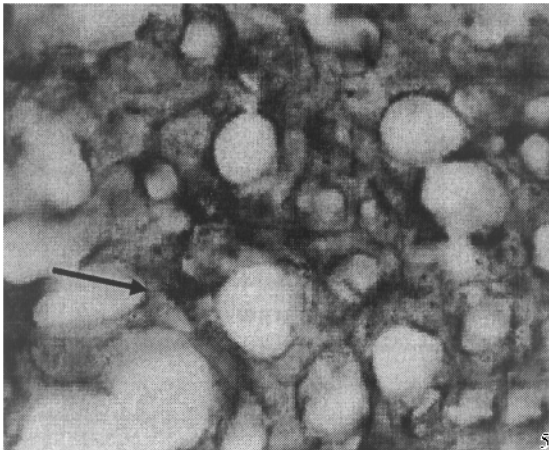
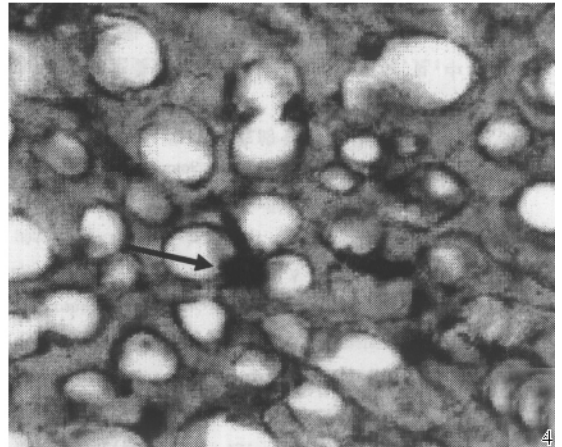
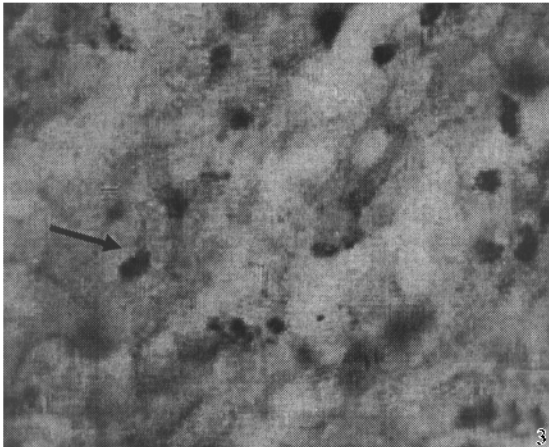
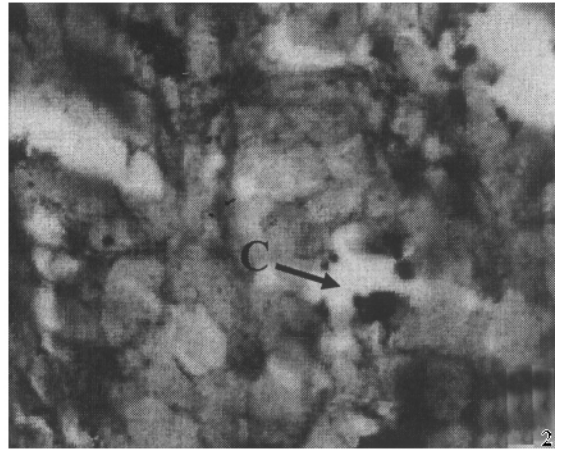
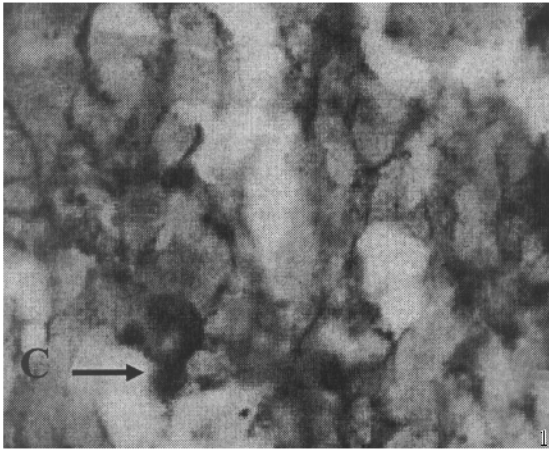
阿依木古丽等 雌激素对大鼠肾上腺皮质中 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响

图版 I

Ayimuguli *et al.* :Effects of Estrogen on Bcl-2 and Bax Expression in Rat

Adrenal Cortex

Plate I



1. C 组束状带 Bcl-2 的表达 × 400 ; 2. OVX 组束状带 Bax 的表达 × 400 ; 3. OVX + E<sub>2</sub> 组束状带 Bcl-2 的表达 × 100 ; 4. OVX 组网状带 Bcl-2 的表达 × 400 ; 5. OVX 组网状带 Bax 的表达 × 400 ; 6. C 组球状带 Bcl-2 的表达 × 100。  
 → 表示免疫组化阳性产物 C. 表示毛细血管内皮的阳性产物。