

高钼对小鼠肾脏细胞凋亡及 Bax 蛋白表达的影响

林霖^{1,2}, 王宏伟¹, 张才¹, 杨自军¹, 汪纪仓¹, 李勤凡^{2*}

(1. 河南科技大学 动物科技学院, 河南 洛阳 471003; 2. 西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要: 为探讨高剂量钼对小鼠肾脏细胞凋亡及 Bax 蛋白表达的影响, 选用 60 只 35 日龄雌性昆明系小鼠, 随机分成 3 组, 每组 20 只, 对照组、高钼 I 组、高钼 II 组饮水中分别添加 0、200、400 mg/L 钼, 连续染毒 90 d 后取样, H. E 染色检测肾脏组织结构, 原位末端标记法检测肾脏细胞凋亡, 免疫组化检测肾脏 Bax 蛋白表达。结果显示, 高钼 I、II 组小鼠肾小管上皮细胞出现空泡变性、颗粒变性; 高钼 I 组、高钼 II 组小鼠肾脏细胞凋亡率为 2.25%、6.64%, 均显著高于对照组 ($P < 0.01$); 高钼 I、II 组小鼠肾脏 Bax 蛋白表达增强, 与对照组比较差异极显著 ($P < 0.01$)。细胞凋亡参与了高钼致小鼠肾脏损伤过程, 其凋亡机制可能与高钼上调小鼠肾小管细胞 Bax 表达有关。

关键词: 钼; 肾脏; 细胞凋亡; Bax; 小鼠

中图分类号: S865.1⁺3 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2013)01-0118-04

Effect of High Molybdenum on Renal Apoptosis and Expression of Bax in Mice

LIN Lin^{1,2}, WANG Hong-wei¹, ZHANG Cai¹, YANG Zi-jun¹, WANG Ji-cang¹, LI Qin-fan^{2*}

(1. College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China;

2. College of Veterinary Medicine, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

Abstract: To study the renal apoptosis and expression of Bax protein in mice by high-dose molybdenum, sixty 35-day-old female Kunming mice were randomly divided into three groups: control group, high molybdenum group I, and high molybdenum group II. Three groups were treated with drinking water added with 0, 200 and 400 mg/L molybdenum, respectively. On the 90th days of experiment, renal tissue morphological examination, TUNEL, and immunohistochemistry studies were performed. The results showed that granular degeneration and vacuolar degeneration occurred in the renal tubule epithelial cells of mice exposed to molybdenum. Renal apoptotic rate was 2.25% and 6.64% in high molybdenum groups I and II, which were significantly higher than that in the control group ($P < 0.01$). The expressions of Bax protein of renal cortex in high molybdenum groups I and II were significantly higher than that in the control group too ($P < 0.01$). The results indicate that high molybdenum can cause pathological injury and apoptosis of kidney in mice, and the mechanism is related with regulating the expression of Bax protein of renal tubule epithelial cells in mice under high molybdenum.

Key words: molybdenum; kidney; apoptosis; Bax; mice

收稿日期: 2012-08-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(31040081); 河南省科技厅基金科学研究项目(2010B230002)

作者简介: 林霖(1972-), 男, 河南永城人, 实验师, 硕士, 主要从事动物中毒性及营养代谢疾病研究。

E-mail: llzj403@126.com

* 通讯作者: 李勤凡(1968-), 男, 甘肃张家川人, 副教授, 博士, 主要从事动物中毒性及营养代谢疾病研究。

E-mail: liqinfan@yahoo.com.cn

钼(Molybdenum, Mo)是动物必需的微量元素,但机体摄入过多会造成多种组织器官损伤。已有研究表明,高剂量的钼能够导致肾脏组织细胞损伤^[1-2],促进家禽免疫器官细胞凋亡^[3],但高钼致小鼠肾脏病理损伤过程中是否存在促凋亡机制尚未见报道。为此,考察高钼对小鼠肾脏细胞凋亡及 Bax 蛋白表达的影响,以期钼的肾毒性机制研究提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 清洁级 35 日龄健康昆明系雌性小白鼠 60 只,体质量 12~15 g,购自郑州大学实验动物中心。

1.1.2 主要试剂 苏木素、伊红、兔抗小鼠 Bax 多克隆抗体、SABC 免疫组化试剂盒、DAB 显色试剂盒、TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司,其他试剂均为国产优级纯或分析纯。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与处理 小鼠预饲养 1 周,经观察无异常后,随机分为对照组、高钼 I 组、高钼 II 组,分别饮用含钼 0、200、400 mg/L 的去离子水(钼源为钼酸钠)。小鼠常规饲养,自由取食、饮水,进行为期 90 d 的染毒试验。

1.2.2 肾脏组织形态学检测 试验期满,脱颈椎处死小鼠,常规取出肾脏,用多聚甲醛固定,常规制备小鼠肾脏石蜡组织切片,HE 染色,光镜观察肾脏组织结构。

1.2.3 TUNEL 法检测肾脏细胞凋亡 常规制备小鼠肾脏组织石蜡切片,参照试剂盒说明书步骤检测,同时设立阴性对照与阳性对照。阳性细胞判定方法:以光学显微镜下观察到细胞核有棕黄色颗粒者

为凋亡细胞,各组随机取 5 张切片,每张片在 400 倍光镜下观察 10 个视野,计算阳性细胞百分率。

1.2.4 免疫组化检测肾脏组织 Bax 蛋白表达 常规制备肾脏石蜡切片,脱蜡至水,用 3% 的双氧水封闭 20 min,0.02 mol/L PBS 洗 2 遍,每次 2 min,枸橼酸缓冲液高温修复抗原 2 次,0.02 mol/L PBS 洗 2 遍,每次 5 min,正常羊血清封闭 20 min,0.02 mol/L PBS 洗 2 遍,每次 5 min,滴加 1:200 的兔抗小鼠多克隆 Bax 抗体,常温 2 h(22~26 ℃),0.02 mol/L PBS 洗 3 遍,每次 5 min,滴加生物素标记的羊抗兔 IgG,常温孵育 20 min,0.02 mol/L PBS 洗 3 遍,每次 5 min,滴加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素,常温 20 min,DAB 显色约 10 min,苏木素复染 10 s,脱水,透明,封片,镜下观察。阴性对照用 0.02 mol/L PBS 替代一抗。

结果判定以细胞浆中出现点状棕黄色染色为阳性细胞。细胞计数:每组随机抽取染色清晰的 5 张切片于 400 倍光镜下随机选取 10 个视野,固定窗口面积与光强度,利用 IPP 5.0.1 分析软件测定平均吸光度表示阳性产物的强度。

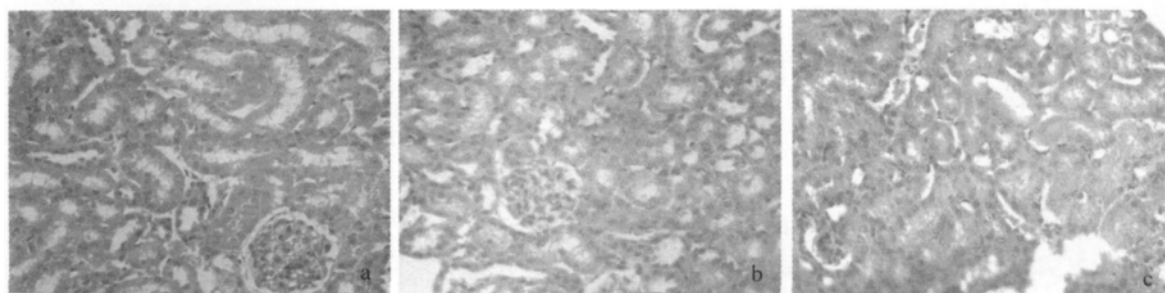
1.3 数据处理

数据采用平均数±标准差表示,利用 SPSS 17.0 统计软件,采取单因素方差分析比较组间差异。

2 结果与分析

2.1 小鼠肾脏组织形态学变化

由图 1 可以看出,对照组小鼠肾脏组织结构正常,无肿胀、变性及坏死现象;高钼 I 组部分近曲小管胞浆基质疏松淡染,肾小管上皮细胞空泡变性;高钼 II 组近曲小管管腔明显缩小,发生颗粒变性及空泡变性的肾小管上皮细胞明显多于高钼 I 组,并有部分肾小球发生萎缩。



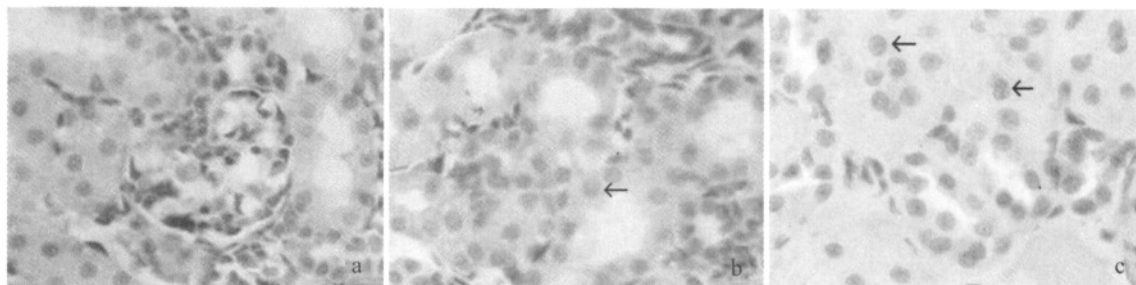
a. 对照组; b. 高钼 I 组; c. 高钼 II 组

图 1 小鼠肾脏组织结构(HE 染色,400×)

2.2 小鼠肾脏细胞凋亡情况

对照组阳性表达细胞极少,高钼组肾脏阳性表达显著增多,且主要为肾小管上皮细胞,肾小体基本未见阳性

细胞表达(图 2)。高钼 I 组细胞凋亡率为 2.25%,极显著高于对照组($P<0.01$),高钼 II 组细胞凋亡率达 6.64%,极显著高于对照组和高钼 I 组($P<0.01$)(表 1)。



a. 对照组; b. 高钼 I 组; c. 高钼 II 组

图 2 小鼠肾脏细胞凋亡情况(TUNEL 法,400×)

表 1 小鼠肾脏细胞凋亡率及 Bax 蛋白表达情况

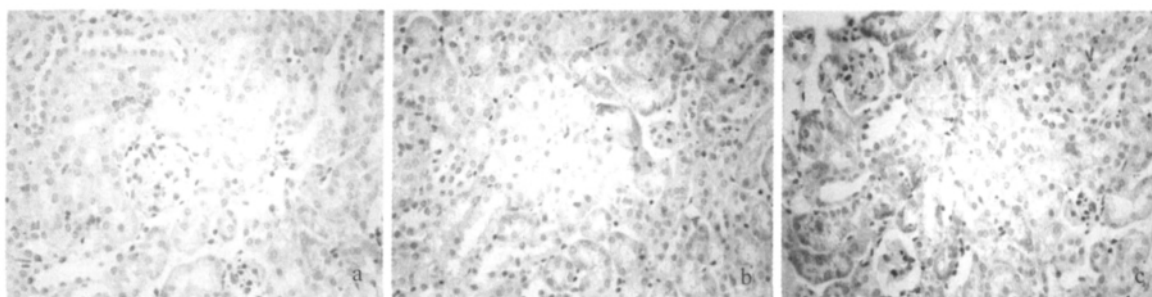
组别	细胞凋亡率/%	Bax 平均光密度
对照组	0.34 ± 0.04 Cc	0.165 ± 0.012 Cc
高钼 I 组	2.25 ± 0.16 Bb	0.260 ± 0.014 Bb
高钼 II 组	6.64 ± 0.39 Aa	0.318 ± 0.011 Aa

注:同列大写字母完全不同表示差异极显著($P<0.01$),小写字母完全不同表示差异显著($P<0.05$)。

2.3 小鼠肾脏 Bax 蛋白表达分布

Bax 蛋白在各组小鼠肾脏组织中均有不同程度

表达,且主要表现在肾小管上皮细胞胞浆内,呈棕黄色颗粒状分布,肾小球基本不表达。由图 3 可以看出,对照组肾小管上皮细胞有少量表达,高钼 I 组肾小管上皮细胞表达较多,高钼 II 组肾小管上皮细胞胞浆表达最强,IPP 5.0.1 软件分析显示:高钼 I、II 组 Bax 蛋白表达的平均光密度极显著高于对照组($P<0.01$),同时,高钼 I、II 组之间差异也极显著($P<0.01$)(表 1)。



a. 对照组; b. 高钼 I 组; c. 高钼 II 组

图 3 小鼠肾脏 Bax 蛋白表达情况(DAB 染色,400×)

3 讨论

动物和人主要以可溶性钼酸根盐(MoO_4^{2-})的形式经胃肠道吸收钼,钼在体内代谢后,最终经肾脏排泄。当高剂量的钼长期暴露,则能在肾脏中蓄积,并导致体内含钼酶黄嘌呤氧化酶(XO)活力升高^[4],血清及肾脏超氧化物歧化酶(SOD)活性降低,以及脂质过氧化产物丙二醛(MDA)含量升高^[1,5-6],表明高钼对肾脏组织细胞产生脂质过氧化作用。另外,过量钼长期暴露,可使体内嘌呤代谢紊乱、血尿酸升高。肾脏受到尿酸及其盐类刺激,可激活白介素 1 和 Src 家族中的酪氨酸激酶,以及 MAPK 等信号传导通路^[7],造成肾组织细胞受损。本试验高剂

量钼染毒小鼠肾脏上皮细胞产生颗粒变形及空泡变性,可能为多种原因共同作用的结果。

细胞凋亡是细胞接受体内信号或刺激而发生的主动的、程序性死亡方式,是一种无炎症反应的死亡,对维持机体内环境稳定发挥重要作用。细胞凋亡不仅参与胚胎的产生、发展与个体形成,还参与许多病理过程,机体可以通过细胞凋亡途径清理发育不正常的细胞及有害细胞,维护机体自身稳定^[8],但过度凋亡,也可导致器官组织结构改变以及功能丧失,并且在较强的毒性因素持续作用下,当线粒体中大量的 ATP 被耗竭,无法满足凋亡所需能量时,细胞严重肿胀、细胞膜破裂、胞质外流、周围炎性细胞浸润,细胞可发生坏死,毒物致肾脏损伤中凋亡与坏

死共存的现象比较常见^[9]。引起细胞凋亡的因素较多,如细胞钙超载、脂质过氧化损伤、DNA 损伤等,其中,氧化应激是生物学界公认的细胞凋亡的主要诱导因素,周变华等^[5]研究表明,高钼可致小鼠机体脂质过氧化损伤,林霖等^[6]研究表明,高钼可致肾脏脂质过氧化损伤。本试验结果发现,试验组小鼠肾脏细胞凋亡数随补钼剂量的升高而增加,这可能与高钼所致机体及肾脏细胞脂质过氧化损伤有关,但高钼是否会导致肾脏细胞钙超载及(或)DNA 损伤等其他诱导细胞凋亡的因素尚有待研究。

细胞凋亡是一个复杂的过程,现在已明确的转导机制有 3 种,即:死亡受体介导、线粒体激发与内质网应激,其中线粒体途径在细胞凋亡中扮演着重要角色,以线粒体为中心的调控模式的研究已逐渐取代以细胞核为中心的调控模式^[10]。Bax 是参与执行线粒体途径的重要促凋亡因子^[11],属于癌基因 Bcl-2 家族成员,其作用与 Bcl-2 相反,可与 Bcl-2 形成异源二聚体,当 Bax 表达增强,Bax/Bcl-2 比值升高,对抗 Bcl-2 蛋白的抑制细胞凋亡作用增强,细胞凋亡增加^[12];另一方面,Bax 可通过自身构象的改变,插入线粒体外膜形成膜通道,进而促进线粒体膜间隙蛋白(包括细胞色素 c、凋亡诱导因子、Smac/DIABLO)的释放^[13],引起细胞凋亡的发生。林霖等^[6]研究发现,高钼致小鼠肾小管上皮细胞胞浆中膜间隙蛋白 Smac 蛋白高表达,这可能是高剂量钼上调肾脏 Bax 蛋白表达,引起了线粒体膜通道开放,间隙蛋白从线粒体中大量外流的结果。因此可以推断:细胞凋亡参与了高钼致小鼠肾脏损伤过程,凋亡可能通过线粒体调控模式实现。

参考文献:

- [1] 肖杰,崔恒敏,杨帆,等. 高钼对雏鸡肾脏的病理损伤和抗氧化功能的影响[J]. 畜牧兽医学报,2010,41(12): 1598-1604.
- [2] 王宏伟,周变华,张樑,等. 高钼低铜对小鼠肾脏结构及其表达 TNF- α 蛋白的影响[J]. 动物医学进展,2010, 31(9):51-54.
- [3] 郭书周,杨自军,张才. 高钼低铜对小鼠睾丸组织脂质过氧化作用的影响[J]. 河南农业科学,2011,40(4): 145-147.
- [4] 李三强,龙晶,牛映斗. 饮用天然高钼水诱发的钼中毒耕牛主要生物酶测定[J]. 动物营养学报,1998,10(1): 29-33.
- [5] 周变华,林霖,杨自军,等. 钼对小鼠脂质过氧化损伤及肝 Smac 和 Bax 蛋白表达的影响[J]. 中国兽医科学, 2012,42(6):617-621.
- [6] 林霖,李勤凡,汪纪仓,等. 钼暴露对雌性小鼠肾脏脂质过氧化损伤及 Smac 蛋白表达的影响[J]. 中国畜牧兽医,2012,39(8):142-144.
- [7] Toprak O, Cirit M, Esi F, *et al.* Hyperuricemia as a risk factor for contrast-induced nephropathy in patients with chronic kidney disease[J]. Catheter Cardiovasc Interv, 2006,67(2):227-235.
- [8] Seth R, Yang C, Kaushal V, *et al.* p53-dependent caspase-2 activation in mitochondrial release of apoptosis-inducing factor and its role in renal tubular epithelial cell injury[J]. J Biol Chem, 2005,280(35):31230-31239.
- [9] 王会玲,张金元. 关木通所含马兜铃对大鼠肾小管凋亡及 Caspase-3 表达的影响[J]. 上海中医药杂志,2007, 41(11):70-73.
- [10] Loelflor M, Kroemer G. The mitochondria in cell death control: Certainties and incognita[J]. Exp Cell Res, 2000,256(1):19-26.
- [11] Robertson J D, Orrenius S. Molecular mechanisms of apoptosis induced by cytotoxic chemicals[J]. Crit Rev Toxicol, 2000,30(5):609-627.
- [12] Shimizu S, Narita M. BCL-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome C by the mitochondrial channel VDAC[J]. Nature, 1999,399:483-487.
- [13] Willis S N, Adams J M. Life in the balance: How BH3-only proteins induce apoptosis[J]. Curr Opin Cell Biol, 2005,17(6):617-625.