

离水花蛤鲜度和组织形态及 Bax 蛋白的表达变化

张美萍¹, 张希春^{2,*}, 林为金², 陈发河², 黄志勇²

(1.山西师范大学生命科学学院, 山西 临汾 041004; 2.集美大学生物工程学院, 福建 厦门 361021)

摘 要: 为了解日常生活中花蛤离水放置后的生存状态及细胞凋亡在此过程中的作用及其机制。在 4℃ 和 25℃ 条件下将离水花蛤分别放置 2、6、12、24h 和 2、4、6h, 利用挥发性盐基氮测定、HE 染色和免疫组化 SABC 法研究花蛤鲜度、形态学及促凋亡蛋白 Bax 的表达变化, 探讨细胞凋亡在保鲜保活花蛤中的作用。结果表明, 随着离水时间的延长, 花蛤组织细胞趋于松散, 肌纤维断裂, 颗粒化程度加深。4℃ 和 25℃ 下 Bax 的表达呈相似的变化趋势, 但 25℃ 下的变化进程明显快于 4℃ 下。因此, 放置温度及离水时间对花蛤组织形态及促凋亡蛋白 Bax 表达均有相似趋势的影响。

关键词: 花蛤; 细胞凋亡; 免疫组织化学; Bax 蛋白

Changes in Freshness and Morphology of *Ruditapes philippinarum* out of Water as well as Expression of Bax Protein

ZHANG Mei-ping¹, ZHANG Xi-chun^{2,*}, LIN Wei-jin², CHEN Fa-he², HUANG Zhi-yong²

(1.School of Life Science, Shanxi Normal University, Linfen 041004, China;

2.College of Bioengineering, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract : The survival condition of *astartella(Ruditapes philippinarum)* out of water was explored as well as the contribution of apoptosis to this process. *Astartella* were kept from water for 2, 6, 12 and 24 h at 4 °C and for 2, 4 and 6 h at 25 °C. The freshness, morphology and the expression of pro-apoptotic protein Bax were determined by measurement of total volatile basic nitrogen with trace expansion assay, HE staining and immunohistochemical assay. Results showed that the freshness decreases with increasing time being out of water and loosening tissue cells and myofibril fragmentation can be observed as well as the further particles formation. The expression of Bax protein displays the similar pattern at 4 °C and 25 °C. However, the speed of changes at 25 °C is faster than that at 4 °C. All these results suggested that the effect of storage temperature and treatment period of being out of water have similar pattern on the freshness and morphology, as well as the expression of Bax protein in *Ruditapes philippinarum*.

Key words: *Ruditapes philippinarum*; apoptosis; immunohistochemical method; Bax protein

中图分类号: S983

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)07-0206-04

菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*), 福建俗称“花蛤”, 属于海产双壳类帘蛤目帘蛤科蛤仔属。日常生活中, 人们对购买的花蛤首先要进行吐沙处理, 而后进行烹饪或离水放置一段时间后再烹饪。放置的时间

及温度将影响到花蛤呈味物质的产生、鲜度变化、营养价值等。本研究通过挥发性盐基氮测定、形态学观察及促细胞凋亡蛋白 Bax 的免疫组化分析, 研究在 4℃ 与 25℃ 条件下离水花蛤鲜度与组织形态变化及细胞凋亡

收稿日期: 2008-05-22

基金项目: 集美大学创新团队基金项目(2006A003)

作者简介: 张美萍(1975-), 女, 讲师, 博士, 主要从事细胞生物学和食品安全研究。

E-mail: zhangmp2006@yahoo.com.cn

* 通讯作者: 张希春(1971-), 男, 副教授, 博士, 主要从事食品营养与安全及食品生物技术研究。

E-mail: xc Zhang@jmu.edu.cn

在保活花蛤中的作用。研究结果有利于提出花蛤贮存和烹饪建议, 有利于花蛤保活机制的进一步研究。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

花蛤于2006年5月在水产市场购得。选择大小均一、80~100粒/kg的花蛤42粒于4℃或25℃自来水中静置2h后分成三组, 一组12粒于4℃离水放置2、6、12、24h, 一组9粒于25℃离水放置2、4、6h。以一组21粒于水静置2h的花蛤为对照进行比较分析。

小鼠抗Bax单克隆抗体 Santa Cruz公司; SABC浓缩型免疫组化染色试剂盒及浓缩型DAB显色试剂盒 武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 仪器与设备

轮转切片机 美国AO公司; Motic数码显微系统 厦门Motic实业有限公司。

1.3 挥发性盐基氮的测定

将花蛤剥壳, 取出可食用部分后, 切碎搅匀, 称取约10.0g, 置于锥形瓶中, 加100ml水, 不时振摇, 浸渍30min后过滤, 滤液置冰箱备用。挥发性盐基氮含量的测定采用微量扩展法^[1]。

1.4 HE染色

常规石蜡包埋切片后, 脱蜡至水, 苏木精染色, 脱水及伊红复染, 经透明、封片后在Motic数码显微镜下观察。

1.5 免疫组化SABC法^[2]

根据Bax一抗说明书建议抗体稀释度要求设定1:200、1:400、1:600几个梯度, 同时对DAB显色时间、苏木素复染时间进行条件优化。结果表明, Bax浓度1:600, DAB显色1.5min, 苏木素复染时间5min条件最优。

切片常规脱蜡至水, 灭活内源性过氧化物酶后微波修复抗原, 经封闭后加入一抗4℃过夜, 滴加生物素化二抗37℃湿盒中孵育20min, 滴加SABC试剂37℃湿盒中孵育30min, DAB显色后中止反应, 苏木素复染, 中性树胶封片。阴性对照以PBS代替一抗。

免疫组化染色后组织切片用Motic数码显微系统在40×的物镜下观察并拍照, 相机和光源的设定保持恒定。照片用Image Pro Plus 5.0图像分析软件测量阳性细胞免疫反应产物的累积光密度(IOD)。

1.6 数据处理与统计方法

所有实验数据经单因素方差分析(ANOVA), 若差异显著再做Duncan's多重比较, 以检验组间差异, 所有分析均使用SPSS 13.0软件进行。

2 结果与分析

2.1 挥发性盐基氮的变化

表1 花蛤挥发性盐基氮的变化

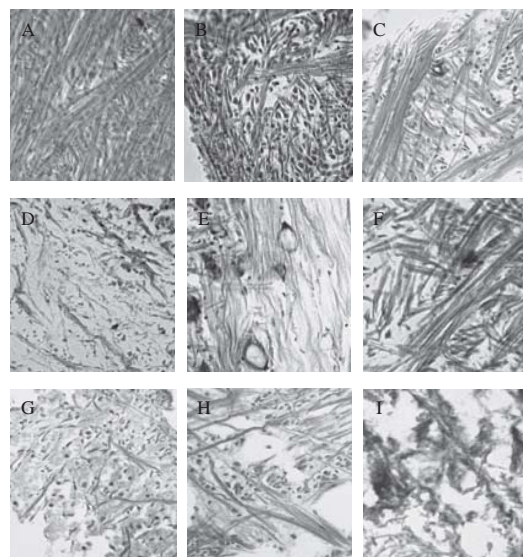
Table 1 Changes of total volatile basic nitrogen of *Ruditapes philippinarum* being out of water for different time at 4 °C and 25 °C

温度	状态	挥发性盐基氮(mg/100g)
4℃	在水对照	1.30 ± 0.13
	离水 2h	1.45 ± 0.09
	离水 6h	4.11 ± 0.06*
	离水 12h	4.83 ± 0.18*
	离水 24h	6.60 ± 0.18*
25℃	在水对照	1.37 ± 0.24
	离水 2h	2.74 ± 0.20
	离水 4h	4.11 ± 0.08*
	离水 6h	4.39 ± 1.33*

注: *.与对照组相比, 差异显著($p < 0.05$)。下同。

由表1可知, 4℃下挥发性盐基氮在离水6、12和24h与对照组相比, 都出现显著性增加($p < 0.05$)。25℃下离水12、24h后的花蛤明显变质腐败, 发出恶臭, 未进行挥发性盐基氮测定。25℃下离水2h内花蛤的挥发性盐基氮变化不显著, 4h和6h后挥发性盐基氮相比于对照组有显著增加($p < 0.05$)。在25℃下6h时挥发性盐基氮含量的值就接近与4℃、12h时的值, 表明了25℃下挥发性盐基氮生成速率高于4℃下挥发性盐基氮的生成速率。

2.2 花蛤的形态变化



A.4℃在水; B.4℃离水2h; C.4℃离水6h; D.4℃离水12h; E.4℃离水24h; F.25℃在水; G.25℃离水2h; H.25℃离水4h; I.25℃离水6h。下同。

图1 花蛤斧足的形态变化(×400)

Fig.1 Morphological changes of *Ruditapes philippinarum* being out of water for different time at 4 °C and 25 °C (× 400)

4℃下在花蛤的斧足中,肌肉纤维及细胞质被伊红染成红色,与核被苏木素染成蓝紫色形成对比。花蛤在水时的细胞排列紧密;离水2h时排列稍微分散;离水6h时肌纤维断裂,破碎样改变,组织颗粒化;离水12h时肌纤维断裂严重,肌丝分散变细;离水24h时肌纤维断裂严重,破碎样改变或肌丝消失,颗粒化改变,炎性细胞浸润且多出现在邻近表皮位。总体上随着离水培养时间的增加,组织肌纤维变松散,且肌纤维大小不均,部分肌纤维断裂,甚至出现空泡(图1A~E)。

25℃下花蛤斧足形态变化的进程与4℃时相近,但放置相同时间(6h)的肌纤维更分散,肌纤维大多数出现断裂,少数出现空泡(图1F~I)。

如图2所示,在花蛤的内脏团中,在水时细胞排列整齐,细胞核清晰可见。25℃与4℃离水的表现基本一致,4℃离水2、6h时细胞排列分散,颗粒化改变,离水12、24h时也表现为组织细胞严重分散。总体上随着离水培养时间的增加,组织细胞变松散。但由于花蛤内脏团组织结构复杂,同时相同组织器官又缺乏可参照比较的图片数据,详尽准确的分析有一定困难。

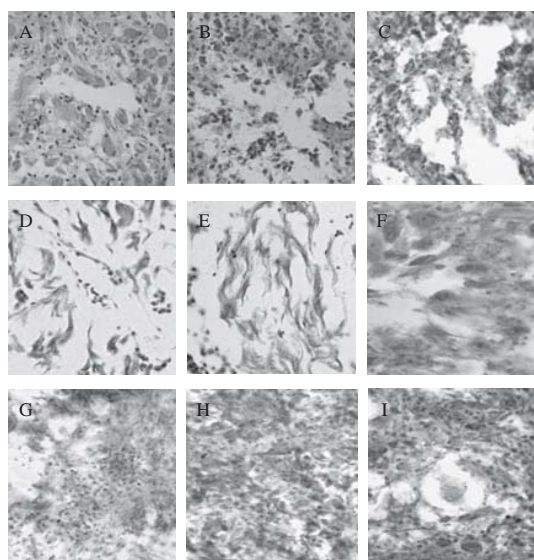


图2 花蛤内脏团的形态变化(×400)

Fig.2 Morphological changes of *Ruditapes philippinarum* being out of water for different time at 4 °C and 25 °C(×400)

2.3 花蛤细胞凋亡调控蛋白 Bax 的表达变化

在4℃和25℃条件下,花蛤斧足和内脏团均有被染成棕褐色的阳性细胞,在水时阳性细胞比较稀少,而离水后阳性细胞呈逐渐增加的趋势。

由表2可知,花蛤斧足 Bax 表达在4℃时,与在水对照比较,离水12h和24h差异显著($p < 0.05$);25℃时离水2h和6h的差异显著($p < 0.05$)。内脏团中 Bax 表达在4℃时,与在水对照比较,离水2、12和24h的

差异显著($p < 0.05$);25℃时,离水2h和6h的差异显著($p < 0.05$)。

表2 Bax 阳性细胞免疫反应产物的累积光密度

Table 2 Integrated optical density of immunoreactive product of Bax protein positive cells in *Ruditapes philippinarum* being out of water for different time at 4 °C and 25 °C

部位	温度	状态	IOD
斧足	4℃	在水对照	0.230 ± 0.028
		离水 2h	0.274 ± 0.020
		离水 6h	0.246 ± 0.044
		离水 12h	0.300 ± 0.059*
		离水 24h	0.318 ± 0.029*
	25℃	在水对照	0.280 ± 0.033
		离水 2h	0.317 ± 0.010*
		离水 4h	0.297 ± 0.015
		离水 6h	0.362 ± 0.013*
		离水 12h	0.342 ± 0.034*
内脏团	4℃	在水对照	0.291 ± 0.047
		离水 2h	0.339 ± 0.036*
		离水 6h	0.317 ± 0.024
		离水 12h	0.342 ± 0.034*
		离水 24h	0.413 ± 0.040*
	25℃	在水对照	0.287 ± 0.057
		离水 2h	0.364 ± 0.058*
		离水 4h	0.333 ± 0.047
		离水 6h	0.384 ± 0.024*
		离水 12h	0.342 ± 0.034*

花蛤斧足、内脏团无论在4℃还是25℃条件下均表现出相似的变化趋势。在离水初期(4℃下2h,25℃下2h)Bax表达较对照均有所提高,而后(4℃下6h,25℃下4h)又下降到与对照相近的程度,在此后(4℃下12、24h,25℃下6h)则升高,与对照相比差异显著($p < 0.05$)。这种变化与离水的初期细胞的应激性反应和离水后呼吸减弱有关。

3 讨论

HE染色结果表明,4℃下24h内与25℃下6h内花蛤组织细胞表现为相似的形态学改变,离水放置后肌纤维等逐步表现为松散、断裂等。但25℃时的改变进程较4℃快,这与花蛤肌体中各种生物酶的活性及自身代谢水平有关。花蛤斧足结构单一,易于观察到明显的形态改变,而内脏团由于其组织器官结构复杂,同时缺少可参照的相同组织器官对照图片,对其形态改变的观察受到一定程度的限制。进一步研究需要详细了解花蛤各组织在正常生理状态下的形态学特征,以及在特定生理状态如保活过程中的形态学改变。

细胞凋亡是由基因控制的自主性死亡方式,是主动的、程序性的、细胞固有的生物学过程。细胞凋亡是一系列酶参与的级联反应,涉及多基因的表达和调控,

其中 Bax 的主要作用是促凋亡, 通过与 Bcl-2 以同源或异源二聚体形式发挥作用, 当 Bax 同源二聚体形成时, 便诱导凋亡^[3-5]。单从 Bax 的表达变化来看, 花蛤在离水后初期凋亡作用增强, 这可能与离水后生活条件的突然改变所导致的应激以及由此产生的各种损伤有关; 由于离水后呼吸减弱, 代谢下降, 花蛤在以后的时间(4℃下 2h, 25℃下 4h), 凋亡作用同其他生物过程一样表现为下降, 与在水花蛤基本相近; 随离水时间的延长, 花蛤受外界因素及微生物等影响的程度增强, 受损伤程度增强, 此时保活状态下的花蛤凋亡作用加强, 以清除损伤细胞。本研究的时间范围内, Bax 的表达整体呈上升趋势, 但随着离水时间的延长, 凋亡作用将受到抑制, Bax 的表达也必然有所改变, 最终花蛤细胞也将

表现为坏死, 花蛤逐渐变质以至腐败, 详细的进程及机制需要进一步研究的证实。

参考文献:

- [1] 周德庆, 马敬军, 徐晶晶. 水产品鲜度评价方法研究进展[J]. 莱阳农学院学报, 2004, 21(4): 312-315.
- [2] 王文勇, 李玉松, 赵一岭. SP, ABC, SABC 和 EnVision 法敏感性的比较[J]. 第四军医大学学报, 2004, 25(7): 572-576.
- [3] 范京惠, 左玉柱, 李一经. 细胞凋亡的研究进展[J]. 东北农业大学学报, 2005, 36(6): 804-807.
- [4] YANG J, LIU X, BHALLA K. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome from mitochondria blocked[J]. Science, 1997, 275: 1129.
- [5] NILGUN K, FATMA A, HAKAN K, et al. Immunohistochemical expression of PTEN in normal, hyperplastic and malignant endometrium and its correlation with hormone receptors, Bcl-2, Bax, and apoptotic index[J]. Pathology-Research and Practice, 2007, 203: 153-162.