

## 脱氧胆酸诱导正常人食管黏膜上皮细胞凋亡及其机制探讨

近年来有关十二指肠内容物对食道粘膜的损伤作用越来越受到国内外学者的重视,尤其是在胃食管反流病的并发症如反流性食管炎、Barrett's食管以及食管癌的发生发展过程中所起的作用。动物实验已证实胆汁反流有明显的致癌作用[1]。在多种十二指肠反流物质中,胆酸被认为是较严重的损伤物质。以往学者多认为亲脂性胆酸可引起食管黏膜细胞膜渗透性增高而致细胞坏死[2]。在对肝细胞[3]和结肠肿瘤细胞[4]的体外研究中发现,一些胆酸可诱导细胞凋亡。但是,目前有报道认为胆酸可引起食管上皮细胞内COX-2表达增加[5],而COX-2的高表达则会抑制凋亡[6]。所以,有必要明确胆酸是否诱导食管黏膜上皮细胞凋亡,此方面的研究尚未见报道。本实验观察脱氧胆酸(DC)对体外培养的人正常食管黏膜上皮细胞的作用,观察其是否诱导细胞凋亡,同时对其机理进行探讨。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

无血清的角朊细胞培养基(KSF-M)和DMEM培养基购自Gibco公司;脱氧胆酸(deoxycholate, DC)购自Sigma; Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒 I 和 Fitc-结合单克隆激活的Caspase-3抗体试剂盒 I 购自 BD Biosciences。Fas、Bcl-2和Bax单克隆抗体及辣根过氧化物酶标二抗购自中杉。动物细胞凋亡DNA Ladder提取试剂盒购自北京鼎国生物公司。

#### 1.2 方法

1.2.1 正常食管黏膜细胞培养[7]从新鲜(仅离体数分钟)食管手术标本上选取正常黏膜部分,在4℃条件下Dispase消化18~24 h后,将黏膜层撕下,放入2.5 g/L胰酶中,37℃消化5~10 min。将消化所得细胞用K-SFM(其中每500 ml含0.9 ml牛垂体提取物、0.438 g L-谷氨酰胺、3 μl表皮生长因子)在37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养并传代。选取第3~5代细胞进行如下实验。

#### 1.2.2 凋亡的观察

1.2.2.1 凋亡的诱导 观察培养食管黏膜上皮细胞在250 μmol/L和500 μmol/L DC作用不同时间点的变化。实验中直接将DC溶解于培养基中,pH为7.1~7.3。培养基中加入250 μmol/L和500 μmol/L的DC后,指示剂的颜色仍为红色,可见此浓度的DC并不能大幅度的降低培养基pH值。

1.2.2.2 碘化丙啶(PI)单染色流式细胞仪(FCM)分析凋亡 采用PI染色法,FCM分析。

1.2.2.3 Annexin V-FITC和PI双染色FCM分析凋亡

离心收集培养基中悬浮细胞,胰酶消化收集贴壁生长细胞。将两细胞混合,按照试剂盒说明操作,进行Annexin V-FITC和PI双染色后,FCM检测1万个细胞,分析早期凋亡细胞后,进行组间对照观察。

1.2.2.4 细胞凋亡原位检测(TUNEL试验) 按试剂盒方法进行。

1.2.2.5 DNA梯度降解检测 收集细胞,按试剂盒说明实验步骤提取DNA,以1%琼脂糖凝胶电泳观察。

1.2.3 FCM分析激活的Caspase-3 收集细胞,按照试剂盒说明操作,流式细胞仪检测检测1万个细胞,分析后进行组间对照观察。

1.2.4 免疫印迹法分析Fas、Bcl-2和Bax蛋白表达

对250 μmol/L DC作用的不同时间细胞进行免疫印迹法分析,观察3种蛋白表达。裂解细胞,提取总蛋白。制备12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶。采用Bio-Rad公司的垂直电泳装置进行电泳。按Bio-Rad公司转膜装置将蛋白样本转移至PVDF膜上,依次封闭,滴加一抗,二抗,DAB显色。

#### 1.3 统计学处理

采用 $\chi^2$ 检验和t检验。

### 2 结果

#### 2.1 DC诱导凋亡

DC可诱导食管黏膜上皮细胞凋亡。在500 μmol/L混合胆酸作用2 h时,相差显微镜下即可见到一些凋亡的形态学变化(图1),如细胞皱缩、胞核浓缩,于4 h见部分细胞不再贴壁,而变成悬浮状态,细胞由卵圆形变为圆形。PI单染FCM分析显示,DC诱导的细胞凋亡与浓度和作用时间正相关(图2)。500 μmol/L混合胆酸作用2、4 h时,FCM分析显示前-G1期细胞分别达19.5%和75.3%,而250 μmol/L作用2 h仅为1.9%,12 h达16.5%。Annexin-V结合PI双染FCM分析显示,500 μmol/L DC作用1 h时,早期凋亡细胞即达8.2%,显著高于正常的2.3%( $P<0.01$ ) (图3)。TUNEL检测(图4)和凝胶DNA 梯度电泳(图5)也证实DC确实诱导了细胞凋亡。

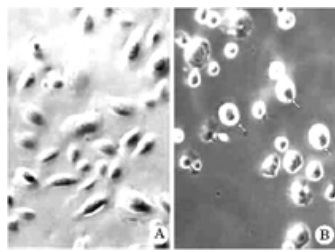


图1 细胞凋亡相差显微镜观察

Fig.1 Phase-contrast microscopic images of apoptosis cells (Original magnification:  $\times 200$ )

A: Control; B: Cells treated with 500  $\mu\text{mol/L}$  deoxycholate for 4 h

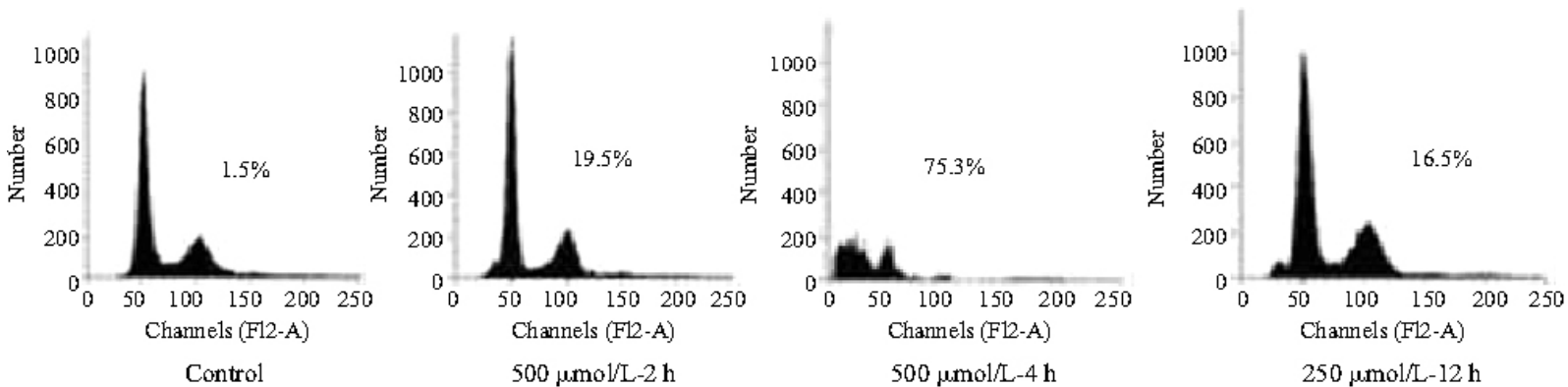


图2 PI单染FCM分析前-G1期

Fig.2 Flow cytometry with only PI-staining showing deoxycholate-induced cell apoptosis in Sub-G1 phase

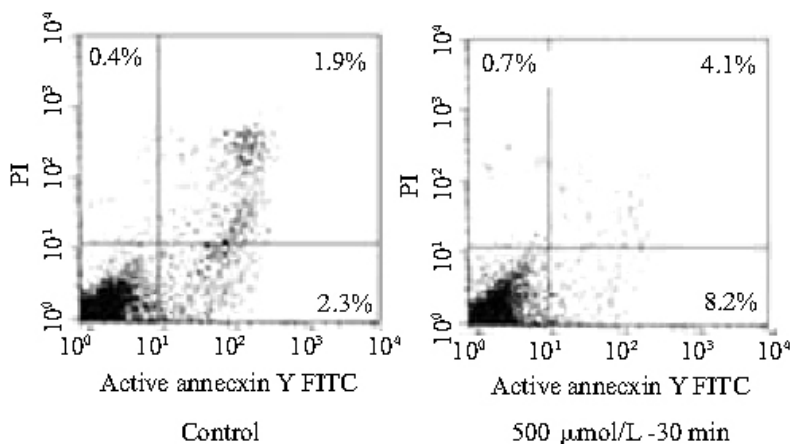


图3 PI和Annexin-V双染FCM分析早期凋亡细胞

Fig.3 Early apoptotic cells detected by flow cytometry with Annexin-V conjugated with PI staining

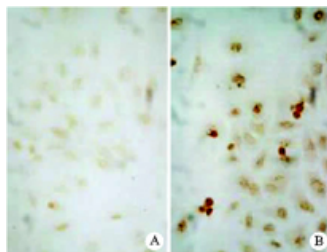


图4 TUNEL检测凋亡细胞

Fig.4 Cell apoptosis detection with TUNEL assay (Original magnification:  $\times 400$ )

A: Control; B: Cells treated with 500  $\mu\text{mol/L}$  deoxycholate for 2 h

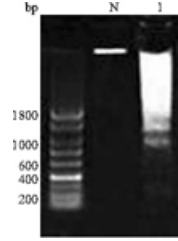


图5 DNA梯度电泳分析

Fig.5 Electrophoresis for DNA ladder analysis

N: Control; Lane 1: Cells treated with 500  $\mu\text{mol/L}$  deoxycholate for 4h

## 2.2 激活状态的Caspase-3变化

FCM分析了经500  $\mu\text{mol/L}$  DC作用30 min正常食管黏膜上皮细胞，结果(图6)显示：含激活状态caspase-3的细胞较对照组明显增高( $P < 0.01$ )。

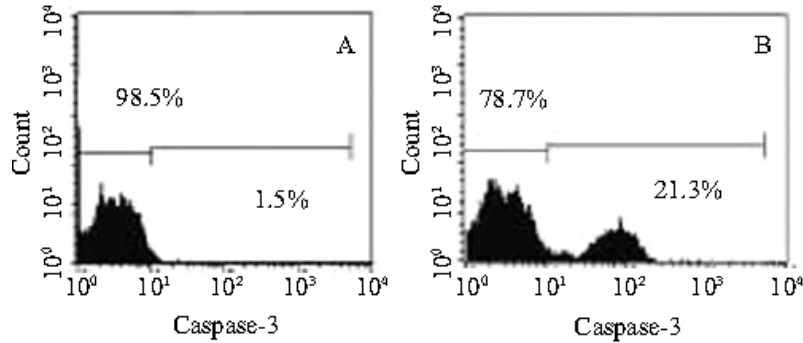


图6 DC引起含激活状态Caspase-3的细胞增加

Fig.6 Flow cytometry of cells with anti-active caspase-3 antibodies

A shows that the untreated cells are primarily negative for active caspase-3 (only 1.5% are positive); B shows that about 21.3% of the cell population treated with 500  $\mu\text{mol/L}$  deoxycholate for 30 min are positive for active caspase-3.

## 2.3 Fas、Bcl-2和Bax蛋白的表达

观察了250  $\mu\text{mol/L}$  DC作用6和12 h时3组细胞Fas、Bcl-2和Bax蛋白表达水平的变化。结果(图7)显示，随着时间延长，Bcl-2 蛋白表达水平下降，而Bax蛋白则上升。DC干预前后均未见Fas蛋白表达。

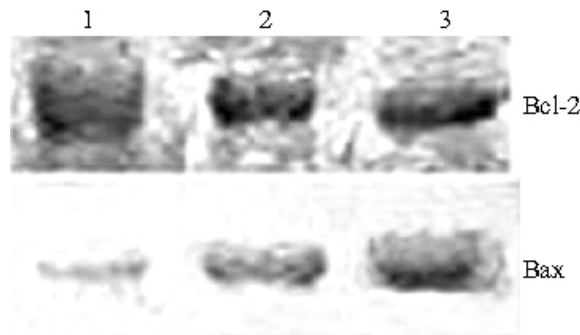


图7 Western blot分析DC干预细胞Bcl-2和Bax蛋白表达

Fig.7 Western blot analysis Bcl-2 and Bax expression in normal esophageal epithelial cells treated with 250  $\mu\text{mol/L}$  deoxycholate

Lane 1: Control cells; Lanes 2, 3: Cells treated with 250  $\mu\text{mol/L}$  deoxycholate for 6 and 12 h, respectively

## 3 讨论

DC是胆酸中的重要成分，参与了胆汁反流时对食管黏膜的损伤。由于DC的疏水性，在水中溶解度很低，但是实验观察到其在水中溶解的饱和度可达700  $\mu\text{mol/L}$ [8]。本实验中采取将DC直接溶于培养基中进行实验，同时也证实，500  $\mu\text{mol/L}$ 的DC是完全可溶解的。与以往学者多认为的亲脂性胆酸引起食管黏膜细胞膜渗透性增高而致细胞坏死[2]不同，通过4种凋亡方法的共同检测，本实验结果显示DC在250和500

$\mu\text{mol/L}$ 可诱导细胞凋亡, 并成浓度-时间正相关性变化。胆酸能影响培养液pH值, 而pH可影响细胞的生长。然而, 在DC为250和500  $\mu\text{mol/L}$ 时, 并不能大幅度改变培养基的pH, 所以在此浓度时, 我们认为胆酸对细胞的作用与培养基的pH是无关的。在对结肠癌细胞的研究发现, DC和CDC(dihydroxy bile salt)可诱导凋亡[4], 与本实验结果相一致。

新近的研究表明, 胆酸诱导的肝细胞凋亡与Fas 受体(CD95/Apo-1)途径相关[9], 而对结肠癌细胞的研究则显示, DC诱导细胞凋亡并不是通过Fas途径[4]。本实验观察到DC作用后活化Caspase-3阳性细胞增多, 证实DC诱导培养的正常食管黏膜细胞的凋亡中是以Caspase-3的激活为信号途径。但是, Caspase-3的激活是多种诱导凋亡信号的共同途径, 如在凋亡的Fas/FasL、线粒体和内质网三种信号途径中均有Caspase-3的激活。本结果显示, 培养的正常食管黏膜细胞及DC干预后Fas均为阴性表达, 说明DC并不是通过Fas-L/Fas系统来诱导食管黏膜细胞凋亡的。作为线粒体凋亡途径的主要物质, Bcl-2蛋白家族调节着凋亡的发生, 其主要是抑制凋亡发生, 其代表为Bcl-2、Bcl-xl, 而与之结合后抑制起作用的蛋白如Bax和Bad的表达增加则促进凋亡发生[10]。本实验结果发现DC干预的细胞Bcl-2减少, Bax增加, 说明线粒体凋亡途径参与了DC诱导的培养的正常食管黏膜细胞的凋亡。

总之, 本实验结果证明, DC诱导了细胞凋亡, 呈浓度时间正相关性变化。此凋亡的发生与Fas-L/Fas信号系统无关; 存在Caspase-3的激活, Bcl-2的减少和Bax的增加, 即DC 诱导体外培养的正常食管黏膜细胞的凋亡与线粒体凋亡调节途径密切相关。

#### 参考文献:

- [1]Jankowski JA, Anderson M. Review article: management of oeso- phageal adenocarcinoma-control of acid, bile and inflammation in intervention strategies for Barrett's oesophagus[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2004, 20 (Suppl 5): 71-80.
- [2]Stein HJ, Kauer WK, Feussner H, et al. Bile acids as components of the duodenogastric refluxate: detection, relationship to bilirubin, mechanism of injury, and clinical relevance[J]. Hepatogastro- enterology, 1999, 46(25): 66-73.
- [3]Torchia EC, Stolz A, Agellon LB. Differential modulation of cellular death and survival pathways by conjugated bile acids[J]. BMC Biochem, 2001, 2(1): 11.
- [4]Schlottman K, Wachs FP, Krieg RC, et al. Characterization of bile salt-induced apoptosis in colon cancer cell lines[J]. Cancer Res, 2000, 60(15): 4270-6.
- [5]Shirvani VN, Ouatu-Lascar R, Kaur BS, et al. Cyclooxygenase 2 expression in Barrett's esophagus and adenocarcinoma: Ex vivo induction by bile salts and acid exposure[J]. Gastroenterology, 2000, 118(3): 487-96.
- [6]Sawaoka H, Kawano S, Tsuji S, et al. Cyclooxygenase-2 inhibitors suppress the growth of gastric cancer xenografts via induction of apoptosis in nude mice[J]. Am J Physiol, 1998, 274(6 Pt 1): G1061-7.
- [7]张 茹, 龚 均, 王 晖, 等. 人正常食管黏膜上皮细胞的纯化分离和传代培养[J]. 第四军医大学学报, 2005, 26(16): 1468-71.
- Zhang R, Gong J, Wang H, et al. Improvement of human esophageal squamous epithelial cells isolation and subculture[J]. J Fourth Mil Med Univ, 2005, 26(16): 1468-71.
- [8]Kishida T, Taguchi F, Feng L, et al. Analysis of bile acids in colon residual liquid or fecal material in patients with colorectal neoplasia and control subjects[J]. J Gastroenterol, 1997, 32(3): 306-11.
- [9]Sodeman T, Bronk SF, Roberts PJ, et al. Bile salts mediate hepato- cyte apoptosis by increasing cell surface trafficking of Fas[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2000, 278(6): G992-9.
- [10]Tsujiimoto Y, Shimizu S. Bcl-2 family: life-or-death switch[J]. FEBS Lett, 2000, 466(1): 6-10.