

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

张茹¹, 龚均¹, 王晖², 王利¹, 冉力伟¹ (¹西安交通大学第二医院, 陕西西安 710004; ²陕西省第一人民医院麻醉科, 陕西西安 710024)

摘要:目的 观察脱氧胆酸(deoxycholate, DC)能否诱导体外培养的人正常食管黏膜上皮细胞凋亡, 并探讨其机制。方法 采用无血清的角朊细胞培养基体外培养人正常食管黏膜上皮细胞; 通过流式细胞仪(FCM)观察 DC 干预的细胞经碘化丙啶(PI)单染色后凋亡细胞百分比; Annexin V-FITC 结合 PI 双染色观察早期凋亡细胞比率; TUNEL 试验凝胶 DNA 梯度电泳确定凋亡的发生。通过 FCM 分析干预细胞激活的 Caspase 3 变化, 免疫印迹法观察 Fas 蛋白、Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达情况。结果 4 种凋亡检测方法确定 DC 可诱导体外培养的食管黏膜上皮细胞凋亡, 并成浓度时间正相关性变化。500 $\mu\text{mol/L}$ DC 干预 30 min, 含激活状态 Caspase-3 的细胞达 21.3%, 明显高于对照组的 1.5% ($P < 0.01$)。免疫印迹法示细胞经 DC 干预前后 Fas 受体蛋白均为阴性表达, 但 Bcl-2 蛋白表达水平下降, 而 Bax 蛋白则上升。结论 DC 可诱导人正常食管黏膜上皮细胞凋亡; 此过程与 Fas-L/Fas 凋亡信号系统无关; 而存在 Caspase-3 激活、Bcl-2 减少和 Bax 增加, 即与线粒体凋亡调节途径密切相关。

关键词: 脱氧胆酸; 食管; 黏膜上皮; 凋亡

中图分类号: R333.2; R329.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-2588(2005)10-1240-04

Deoxycholate induces apoptosis in cultured normal human esophageal mucosal epithelial cells

ZHANG Ru¹, GONG Jun¹, WANG Hui², WANG Li¹, RAN Li-wei¹

¹Second Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China; ²Department of Anesthesiology, First People's Hospital of Shannxi Province, Xi'an 710024, China

Abstract: **Objective** To study the effect of deoxycholate in inducing apoptosis of human normal esophageal mucosal epithelial cells *in vitro* and investigate the molecular mechanism. **Methods** Cultured normal human esophageal mucosal epithelial cells were treated with deoxycholate, and the cell apoptosis were evaluated with TUNEL, DNA ladder, flow cytometry with PI-staining, Annexin V-FITC conjugated with PI staining, and Western blotting. **Results** Flow cytometry, TUNEL and DNA ladder demonstrated that deoxycholate could induce apoptosis in normal human esophageal mucosal epithelial cells in a dose- and time-dependent manner. A percentage of 21.3% of the cell population treated with deoxycholate at 500 $\mu\text{mol/L}$ for 30 min exhibited detectable caspase-3 activity shown by flow cytometry, which was significantly higher than the control level (1.5%, $P < 0.01$). Western blotting suggested that deoxycholate down-regulated Bcl-2 protein expression and up-regulated Bax expression, but Fas was negative in the cells before and after deoxycholate treatment. **Conclusions** Deoxycholate could induce apoptosis in cultured human esophageal mucosal epithelial cells. Caspase-3 activation, Bcl-2 protein down-regulation and Bax up-regulation are involved in deoxycholate-induced apoptosis, which does not involve Fas-L/Fas.

Key words: deoxycholate; esophagus; mucosal epithelial cell; apoptosis

近年来有关十二指肠内容物对食道黏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亡^[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

收稿日期: 2005-01-25

基金项目: 卫生部临床学科重点课题(20012130)

Supported by grants for Key Clinical Research Project of the Ministry of Health (20012130)

作者简介: 张茹(1973-), 女, 在读博士研究生, 电话: 029-83785168,

E-mail: zhzhru@sohu.com

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%CO₂ 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 χ^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。

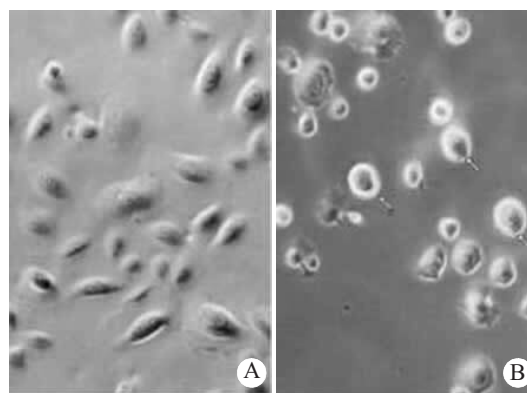


图 1 细胞凋亡相差显微镜观察

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

A: Control; B: Cells treated with 500 μmol/L deoxycholate for 4 h

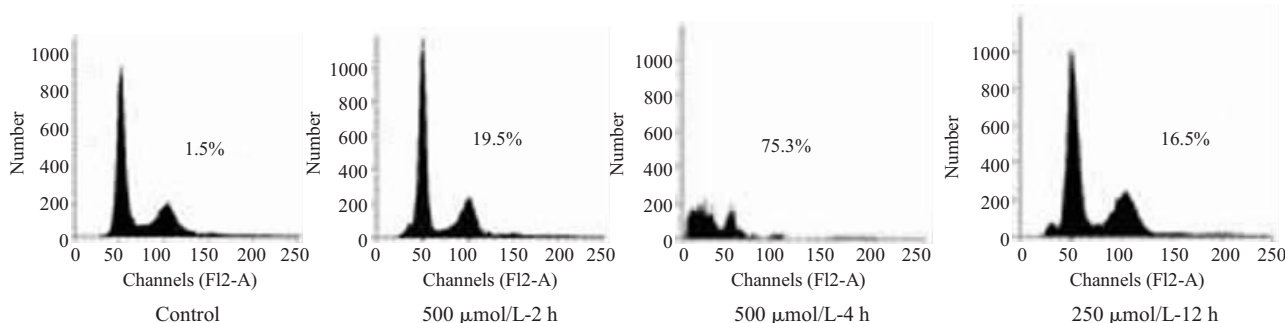


图 2 PI 单染 FCM 分析前 -G1 期

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

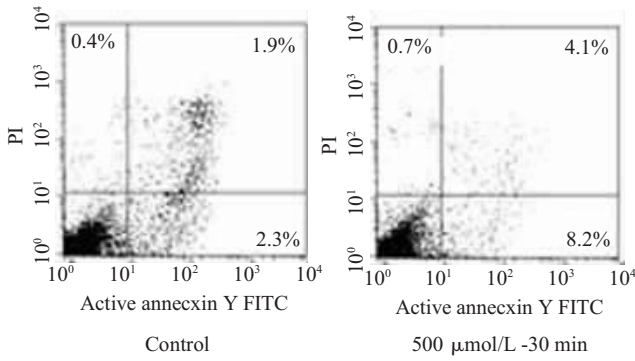


图 3 PI 和 Annexin-V 双染 FCM 分析早期凋亡细胞
Fig.3 Early apoptotic cells detected by flow cytometry with Annexin-V conjugated with PI staining

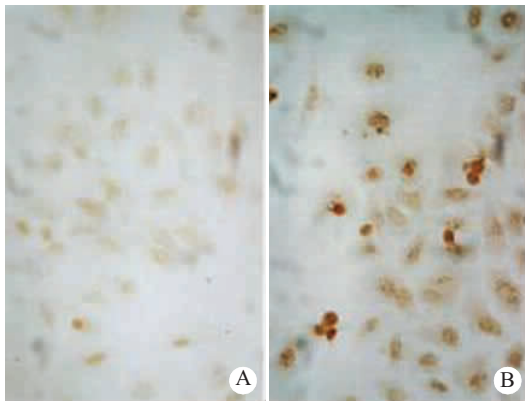


图 4 TUNEL 检测凋亡细胞
Fig.4 Cell apoptosis detection with TUNEL assay
 (Original magnification: ×400)
 A: Control; B: Cells treated with 500 μmol/L deoxycholate for 2 h

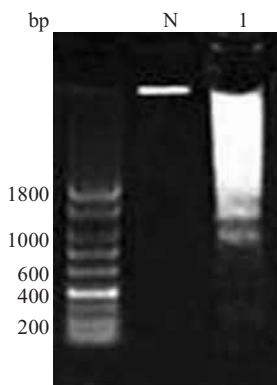


图 5 DNA 梯度电泳分析
Fig.5 Electrophoresis for DNA ladder analysis

N: Control; Lane 1: Cells treated with 500 μmol/L deoxycholate for 4 h

2.2 激活状态的 Caspase-3 变化

FCM 分析了经 500 μmol/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($P<0.01$)。

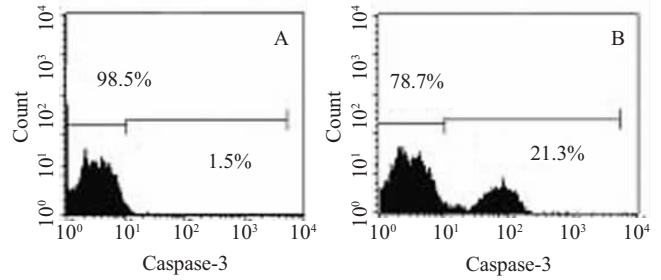


图 6 DC 引起含激活状态 Caspase-3 的细胞增加
Fig.6 Flow cytometry of cells with anti-active caspase-3 antibodies

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 μmol/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 μmol/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。

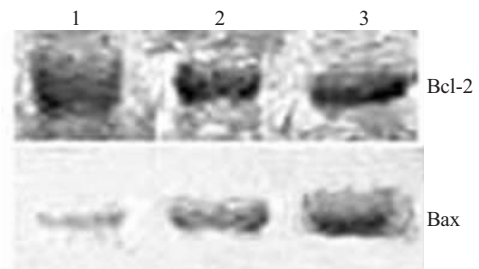


图 7 Western blot 分析 DC 干预细胞 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达
Fig.7 Western blot analysis Bcl-2 and Bax expression in normal esophageal epithelial cells treated with 250 μmol/L deoxycholate

Lane 1: Control cells; Lanes 2, 3: Cells treated with 250 μmol/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 μmol/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 μmol/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亡^[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 μmol/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 oesophageal 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]. *Hepatogastroenterology*, 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 hepatocyte apoptosis by increasing cell surface trafficking of Fas [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2000, 278(6): G992-9.
- [10] Tsujimoto Y, Shimizu S. Bcl-2 family: life-or-death switch [J]. *FEBS Lett*, 2000, 466(1): 6-10.