

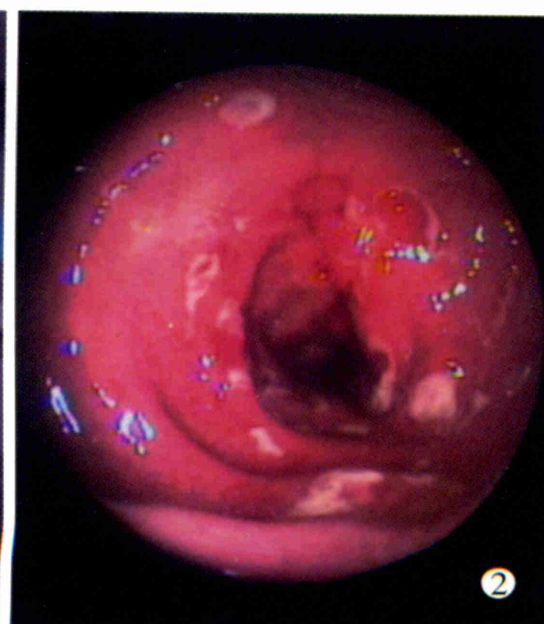
世界华人消化杂志®

**WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2003年8月15日 第11卷 第8期

(Volume 11 Number 8)



8/2003

ISSN 1009-3079



名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

World Journal of Gastroenterology® 被 SCI® -E, Research Alert®, Current Contents® /Clinical Medicine, Journal Citation Reports® Index Medicus, MEDLINE, Chemical Abstracts, EMBASE/ Excerpta Medica 收录. 2002 年 JCR® 报告 WJG 影响因子 2.532. 世界华人消化杂志® 被 Chemical Abstracts, EMBASE/ Excerpta Medica 收录. 2001 年中国科技期刊引证报告: 世界华人消化杂志® 影响因子 3.733, WJG 影响因子 2.920.

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ●

2003 年 8 月 15 日 第 11 卷 第 8 期 (总第 112 期)

述 评

- 1073 乙型肝炎病毒基因组结构与功能复杂性的新认识 成军, 董菁
1081 重视溃疡性结肠炎的诊断和个体化规范化治疗 江学良

病毒性肝炎

- 1083 乙型肝炎病毒中国流行株全基因的克隆与序列分析 成军, 董菁, 洪源, 钟彦伟, 刘妍, 王刚, 王琳
1091 乙型肝炎病毒基因组中前-S 区编码基因的界定 董菁, 成军
1097 乙型肝炎病毒基因组中前-X 编码基因的界定 董菁, 成军
1102 羧基末端截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式激活基因 1 的克隆化研究 刘妍, 成军, 王琳, 王建军, 陆荫英, 李克
1107 乙型肝炎病毒 X 蛋白激活基因 1 的克隆化与序列分析 刘妍, 成军, 王琳, 王建军, 陆荫英, 李克
1114 乙型肝炎病毒前-S2 蛋白结合蛋白基因 S2-29 的克隆化研究 陆荫英, 陈天艳, 成军, 梁耀东, 王琳, 刘妍, 李克, 张健, 邵清, 张玲霞
1118 酵母双杂交技术筛选鉴定乙型肝炎病毒 e 抗原结合蛋白 E-19 的研究 陆荫英, 邵清, 成军, 陈天艳, 王琳, 梁耀东, 刘妍, 张健, 李克, 张玲霞
1122 酵母双杂交技术筛选鉴定乙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白新基因 C-12 的研究 陆荫英, 陈天艳, 成军, 邵清, 梁耀东, 王琳, 刘妍, 张健, 李克, 张玲霞
1126 乙型肝炎病毒 X 蛋白与去唾液酸糖蛋白受体 2 突变体相互作用的研究 陆荫英, 陈天艳, 成军, 梁耀东, 王琳, 刘妍, 张健, 邵清, 李克, 张玲霞
1131 羧肽酶 N 调节乙型肝炎病毒核心启动子表达活性的研究 张忠东, 成军, 钟彦伟, 杨倩, 王业东, 董菁, 杨艳杰, 张树林
1135 丙型肝炎病毒 NS5A 基因变异与干扰素疗效的关系 张琳, 赵桂珍, 石理兰, 曹丽
1139 汉族人 IL-12b 和 IL-10 启动子区基因多态性与 HBV 感染的相关性 李永纲, 刘明旭, 王福生, 金磊, 洪卫国

基础 研究

- 1144 肝外胆管癌组织 BAG-1 与 BAD 表达与凋亡调控的原位定量研究 闫庆国, 师建国, 黄高昇, 张传山, 李青, 胡沛臻, 王文亮
1148 牛磺酸脱氧胆酸损伤线粒体诱导 HepG2 细胞凋亡 李光明, 谢青, 周霞秋, 俞红, 郭清, 廖丹, 李定国
1152 肝硬化大鼠肝部分切除后肝细胞生长周期的调控 陈平, 李昆, 董家鸿, 韩本立
1156 苦参碱对大鼠原位肝移植冷缺血再灌注中肝窦内皮细胞损伤的影响 仇毓东, 朱新华, 史敏科, 丁义涛
1160 犬肝动脉输注阿霉素联合血液灌流的研究 张志友, 张文怡, 钱绍诚
1164 中国人金属基质蛋白酶组织抑制因子-1 基因的克隆与表达 刘双虎, 谭德明, 侯珏, 胡国龄
1168 卡托普利对肝纤维化模型鼠 MMP-2, 3 TIMP-2, 3 表达的影响 李乾, 张桂英, 李新华, 徐美华
1172 垂体后叶素和特利加压素降低门胆汁性肝硬化大鼠门静脉高压对肝组织氧分压的影响 祝建波, 邓利群, 王思元
1175 电泳法检测肝和血清中醇脱氢酶同工酶 宓庆梅, 曹鲁宁, 高春芳
1178 肝细胞生成素核受体的确定及特性 王阁, 陈东风, 胡铭, 王军, 樊丽琳, 张晓荣
1182 PD98059 对乙醛刺激的大鼠肝星状细胞增生的影响 马洪德, 蒋明德, 钟显飞, 解方为, 曾维政
1185 雌二醇对肝纤维化大鼠 I, III 型胶原及 TGF β_1 表达的影响 许君望, 龚均, 冯新利, 茆新明, 罗金燕, 董蕾, 贾皓, 徐贵平
1189 大鼠急性酒精性脂肪肝造模方法的改进 冯志强, 沈志祥, 谭诗云, 罗和生, 漆楚波, 郭洁, 李海霞
1193 丁酸钠联合穿琥宁对人大肠癌细胞 HCT-8 增生的影响 布立民, 纪欣, 韩英, 陈刚, 王志红, 孙淑红
1197 大肠癌组织胸苷磷酸化酶 / 血小板衍生内皮细胞生长因子的表达及意义 余细球, 邓长生, 朱尤庆, 程芳洲
1200 多粘菌素 B 及其模拟肽体外抗内毒素的实验研究 万志红, 王宇明, 刘国栋
1203 肥大细胞在胃嗜酸性肉芽肿发病中的作用 高振军, 罗和生, 操寄望, 余保平, 宋刘来

临床研究	1207 鱼腥草治疗初发型溃疡性结肠炎的临床研究 江学良, 权启镇, 孙自勤, 王要军, 尚瑞莲, 齐凤 1211 奥沙拉秦钠治疗慢性反复发作型溃疡性结肠炎随机对照研究 江学良, 权启镇, 孙自勤, 王要军, 尚瑞莲, 齐凤 1214 抗栓灵含片治疗伴有血小板活化的难治性溃疡性结肠炎 江学良, 权启镇, 孙自勤, 王要军, 尚瑞莲, 齐凤 1219 胃癌前病变演变过程中凋亡相关蛋白和PCNA的表达意义 伍银桥, 王孟薇, 吴本俨, 尤纬缔, 祝庆孚 1223 汉防己甲素抑制肝癌细胞增生的作用 荆绪斌, 李涛, 杨绮华, 郭光华, 胡辉, 陈素钻 1227 美蓝染色放大电子结肠镜观察结肠息肉与组织病理学的关系 苏鲁, 潘洪珍, 翁敬飏, 徐艺华, 陈芳, 洪梅燕 1230 肝硬化患者血浆胃动素、胆囊收缩素、生长抑素及其胃电的改变 张蓉, 闻勤生, 黄裕新, 赵海峰, 田力 1234 肠易激综合征 402 例发病时间分布及症状特征 许小幸, 李定国, 宋光辉, 周惠清, 刘清华
焦点论坛	1237 乙型肝炎病毒基因组结构与功能复杂性的研究进展 成军 1238 准种是乙型肝炎病毒存在的基本方式 成军, 董菁, 刘妍, 王琳, 钟彦伟, 王刚 1240 乙型肝炎病毒 X 基因启动子结构及调节研究 邵清, 成军, 白雪帆 1242 乙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白的研究 梁耀东, 成军, 陆荫英, 吴君, 程明亮 1245 羧基末端截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式激活作用的研究 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩 1248 乙型肝炎病毒 X 蛋白反式激活作用的研究 杨倩, 刘妍, 成军, 王建军, 洪源, 张树林 1250 乙型和丙型肝炎病毒蛋白对于细胞周期素 A 的调节研究 成军, 刘妍, 王琳, 钟彦伟, 王刚 1255 乙型和丙型肝炎病毒对细胞周期素及细胞周期素依赖性蛋白激酶的调节 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩 1258 乙型和丙型肝炎病毒对 MAPKK 信号转导的影响 张忠东, 成军, 钟彦伟, 张树林 1261 乙型和丙型肝炎病毒蛋白对蛋白酪氨酸激酶信号转导的影响 张忠东, 成军, 钟彦伟, 张树林 1264 RNA 干扰与抗肝炎病毒治疗前景的研究 成军, 刘妍, 王琳, 钟彦伟, 王刚
临床经验	1222 一氧化碳中毒伴筋膜间隙综合征的综合治疗 邹淑杭, 马丽萍, 金镇勋, 贺红, 王一玲, 李冰 1267 胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤 21 例 樊丽琳, 陈东风
病例报告	1143 成人不典型郎格罕组织细胞增生症 1 例 王巍峰, 黄启阳, 王志强, 杨云生 1147 慢性酒精性肝损伤致 Gilbert 综合征样改变 1 例 张文瑾, 王晓峰, 赵景民 1192 小肠血管结构不良 2 例 冯瑞娥, 赵大春, 陈杰
消 息	1080 欢迎订阅 2003 年度世界华人消化杂志 1090 欢迎订阅 2003 年度 World Journal of Gastroenterology® 1130 世界华人消化杂志获得 2001 年度百种中国杰出学术期刊 1155 世界胃肠病学杂志英文版获得 2003-2004 年国家自然科学基金重点学术期刊专项基金资助 1226 WJG 搭建我国消化学基础和临床研究惟一国际交流的平台
封面故事	1138 溃疡性结肠炎的基础和临床研究

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名
陈可冀 题写版权刊名
(月刊)

创刊 1993-01-15
改刊 1998-01-25
出版 2003-08-15
原刊名 新消化病学杂志

总顾问 陈可冀
黄象谦
黄志强
黎介寿
刘耕陶
裘法祖
汤钊猷
王宝恩
危北海
吴孟超
吴咸中

社长总编辑 马连生
中文编辑 潘伯荣
王瑾晖
英文编辑 朱丽虹
排版 李少华
校对 李天华

张金哲
张学庸
赵东海
周殿元

编辑 世界华人消化杂志编辑委员会
030001, 山西省太原市双塔西街 77 号
E-mail:wcjd@wjgnet.com

出版 世界胃肠病学杂志社
100023, 北京市 2345 信箱
E-mail: wcjd @ wjgnet.com
http://www.wjgnet.com
电话 (010)85381892
传真 (010)85381893

印刷 北京科信印刷厂

发行 国内 北京报刊发行局
国外 中国国际图书贸易总公司
(100044, 北京 399 信箱)

订购 全国各地邮电局

邮购 世界胃肠病学杂志社发行部
(100023, 北京市 2345 信箱)
电话:(010)85381892
传真:(010)85381893

2003 年版权归世界胃肠病学杂志社所有

本刊已被国内外
检索系统收录

美国《化学文摘(CA)》
荷兰《医学文摘库/医学文摘(EM)》
俄罗斯《文摘杂志(PJ)》
中国科技论文统计与分析
中国学术期刊文摘
中国中医药信息服务网
中国生物医学文献光盘数据库
《中文科技资料目录(医药卫生)》
中国生物医学期刊目次数据库
中国医学文摘外科学分册(英文版)
中国医学文摘内科学分册(英文版)

特别声明
本刊刊出的所有文章不代表世界胃肠
病学杂志社和本刊编委会的观点, 除
非特别声明. 本刊如有印装质量问题,
请与本刊编辑部调换.

ISSN 1009-3079
CN 14-1260/R

邮发代号 82-262

国外代号 M 4481

国内定价
每期 24.00 元 全年 288.00 元

广告经营 14010040

50

www.wjgnet.com

牛磺酸脱氧胆酸损伤线粒体诱导 HepG2 细胞凋亡

李光明, 谢青, 周霞秋, 俞红, 郭清, 廖丹, 李定国

李光明, 谢青, 周霞秋, 俞红, 郭清, 廖丹, 上海第二医科大学附属瑞金医院感染科 上海市 200025
李定国, 上海第二医科大学附属新华医院消化科 上海市 200092
李光明, 男, 1968-09-02 生, 江西进贤县人, 1992 年江西医学院本科毕业, 2002-07 上海第二医科大学硕士毕业, 现为上海第二医科大学博士研究生, 主治医师. 主要从事肝病研究.
项目负责人: 谢青, 200025, 上海市瑞金二路 197 号, 上海第二医科大学附属瑞金医院感染科. xieqing@sh163.net
电话: 021-64311242
收稿日期: 2002-10-18 接受日期: 2002-11-16

Taurodeoxycholic acid induced apoptosis via mitochondrial injury in HepG2 cells

Guang-Ming Li, Qing Xie, Xia-Qiu Zhou, Hong Yu, Qing Guo, Dan Liao, Ding-Guo Li

Guang-Ming Li, Qing Xie, Xia-Qiu Zhou, Hong Yu, Qing Guo, Dan Liao, Department of Infectious Disease, Ruijin Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, China
Ding-Guo Li, Department of Gastroenterology, Xinhua Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200092, China
Correspondence to: Dr. Qing Xie, Department of Infectious Disease, Ruijin Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, China. xieqing@sh163.net
Received: 2002-10-18 Accepted: 2002-11-16

Abstract

AIM: To investigate the molecular mechanism of HepG2 cell apoptosis induced by Taurodeoxycholic acid (TDCA).

METHODS: Morphologic evaluations of apoptosis were performed by HE staining and electro-microscope. DNA fragment was detected by electrophoresis on 1.5 % agarose gel. Apoptosis rate was measured by flow cytometry using PI probe. After incubation of HepG2 cell with TDCA, the release of cytochrome C from mitochondria into cytosol was determined by Western blot analysis, and the activities of Caspase-8,9,3 were evaluated by chromometry.

RESULTS: Incubation of HepG2 cells with 400 $\mu\text{mol/L}$ TDCA for 12 h induced significant cell apoptosis. Flow cytometry analysis showed that apoptosis rate was $50.4 \pm 2.2\%$ following TDCA incubation. The release of cytochrome C from mitochondria to cytosol in a time-dependent pattern was demonstrated during the development of apoptosis with subsequent activation of Caspase-9 and 3 obviously, while the activation of Caspase-8 was slightly involved in this apoptotic pathway.

CONCLUSION: TDCA can induce cell apoptosis mainly through initiating the release of cytochrome C from mitochondria to cytosol and the subsequent activation of procaspase-9.

Li GM, Xie Q, Zhou XQ, Yu H, Guo Q, Liao D, Li DG. Taurodeoxycholic acid induced apoptosis via mitochondrial injury in HepG2 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(8):1148-1151

摘要

目的: 探讨牛磺酸脱氧胆酸(TDCA)诱导HepG2细胞凋亡的分子机制.

方法: 应用HE染色、电镜和DNA电泳对细胞凋亡定性; 应用流式细胞仪对细胞凋亡定量; 检测TDCA诱导HepG2细胞凋亡过程中, 线粒体细胞色素C释放及凋亡特异性蛋白酶 Caspase-3、8、9 活性的变化.

结果: TDCA 400 $\mu\text{mol/L}$ 孵育 12 h 可诱导显著 HepG2 细胞凋亡, 凋亡率为 $50.4 \pm 2.2\%$; TDCA 诱导 HepG2 细胞凋亡过程中, 线粒体细胞色素 C 释放呈时间依赖性增加, 同时伴有 Caspase-9、3 蛋白酶活性显著增高, Caspase-8 活性仅轻度增高.

结论: 启动线粒体细胞色素C释放及随后激活Caspase-9途径, 可能是 TDCA 诱导 HepG2 细胞凋亡的主要机制.

李光明, 谢青, 周霞秋, 俞红, 郭清, 廖丹, 李定国. 牛磺酸脱氧胆酸损伤线粒体诱导 HepG2 细胞凋亡. *世界华人消化杂志* 2003;11(8):1148-1151
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1148.asp>

0 引言

胆汁淤积是一种常见的病理过程, 可由肝内外胆管狭窄、阻塞, 胆汁酸分泌模式改变及长期胃肠外营养等多种原因引起. 疏水性胆汁酸在肝内积聚一直被认为是胆汁淤积性肝病患者肝损伤的主要原因^[1]. 疏水性胆汁酸具有“去垢性”, 可引起肝细胞坏死. 然而, 大量肝活检资料发现, 在大多数胆汁淤积症中, 明显的肝细胞坏死并不多见^[1-5]. 近来报道, 在胆汁淤积性肝病中, 存在明显的肝细胞凋亡现象^[6-9]. 疏水性胆汁酸诱导肝细胞凋亡的确切机制尚未完全阐明, 牛磺酸脱氧胆酸(TDCA)是一种生理性疏水性胆汁酸, 胆汁淤积时其在肝内浓度显著增高. 我们从分子水平探讨了TDCA诱导HepG2细胞凋亡的机制.

1 材料和方法

1.1 材料 HepG2细胞购自中科院上海细胞研究所. RPMI 1640 培养基购自 GIBCO 公司, 培养板和培养皿为 Nunclon 公司产品, 牛磺酸脱氧胆酸(Taurodeoxycholic acid; TDCA)和蛋白酶 K 均为 Sigma 公司产品, 小鼠细胞色素 C 单克隆抗体购自 Pharmingen 公司, Caspase-9 分析试剂盒购自 Chemicon International Inc; Caspase-3 分析试剂盒购自 Medical Biological Laboratories CO, LTD

(MBL); Caspase-8 分析试剂盒购自 Clontech Laboratories Inc; 胰蛋白酶, RNA 酶和羊抗小鼠免疫球蛋白购自深圳晶美生物公司, 新生小牛血清购于杭州四季青公司.

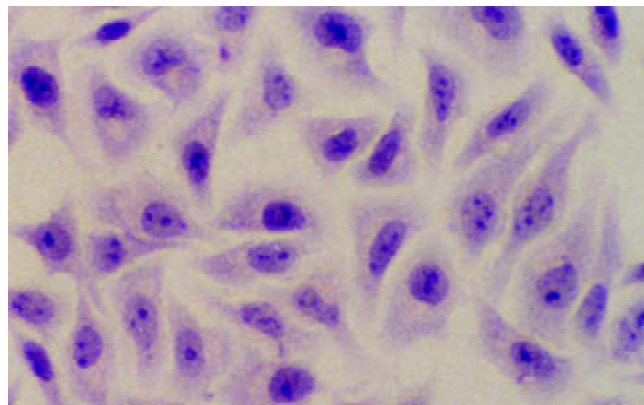
1.2 方法 HepG2 细胞用 RPMI1640 培养基(每 1 000 mL 含 RPMI1640 培养基干粉 10.4 g, Hepes 3.57 g, NaHCO_3 2.0-2.2 g, 青霉素 0.0 625 g, 链霉素 0.1 g) 置 37 °C, 5 % CO_2 培养箱 (NAPCO Series 5 400 CO_2 培养箱) 培养, 细胞贴壁 85-90 % 时, 用 EDTA- 胰酶(每 1 000 ml 含 EDTANa_2 0.2 g, Trypsin 2.5 g, NaCl 8 g, KCl 0.4 g, NaHCO_3 0.58 g, Dextrose 1g) 消化, 以台盼兰拒染试验测定细胞活率, 细胞活率 90 % 以上, 进行传代. 以不同剂量 TDCA 与 HepG2 细胞孵育, 发现 TDCA 400 $\mu\text{mol/L}$ 孵育 12 h 可诱导显著 HepG2 细胞凋亡. 将消化的 HepG2 细胞接种到预先置有无菌盖玻片 3.5 cm 培养皿中, 6 h 细胞贴壁后, 换新鲜培养液并加入 TDCA, 浓度为 400 $\mu\text{mol/L}$, 孵育 12 h, 弃培养皿上清液, 以 PBS 漂洗一次后, 加 40 g/L 甲醛 1 mL 固定 30 min, 然后取盖玻片进行脱水、染色, 透明、封片观察细胞形态变化. 将待检 10 cm 培养皿中培养基弃掉, 加入电镜固定液覆盖培养皿底, 放 4 °C 固定 4 h, 再将细胞刮下, 1 500 r/min, 离心 10 min, 送检. 将培养细胞消化、离心、转移到 1.5 mL eppendorf 管, 加细胞裂解液 450 μL (10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 10 mmol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA, 100 mg/L 蛋白酶 K, 10 g/L SDS), 混匀, 置 37 °C 水浴箱过夜, 以等体积苯酚氯仿抽提. 加 1/10 体积 3 mol/L 醋酸钠, 2 倍体积冰无水乙醇沉淀 DNA, 置 -20 °C, 2 h, 再以 14 000 r/min, 4 °C, 离心 20 min, 弃上清, 加含 RNA 酶 TE (RNase 终浓度为 20 mg/L) 50 μL 溶解 DNA, 取样品 10 μL 于 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳(75 V, 1 h)紫外灯下观察, 并拍照. 贴壁细胞经胰酶消化后, 以 1 500 r/min, 离心 5 min, 弃上清, 加入 PBS 悬浮洗涤一次, 离心, 弃上清, 加柠檬酸固定液 2 mL, 室温静置 30 min, 进行碘化丙啶染色, 流式细胞仪检测细胞凋亡. 收集 TDCA 诱导 6, 9, 12 h 三个时间点的待检细胞 2×10^6 悬浮于 100 μL 预冷细胞裂解液中, 冰上孵育 10 min, 13 000 r/min, 离心 5 min. 将上清液(含胞质抽提物)转移到另一个洁净 1.5 mL 离心管, 置于冰上. 按说明书在标准比色管中依次加入反应缓冲液、双蒸水、胞质抽提物, 最后加入底物. 置 37 °C 恒温箱孵育 2 h. 比色计中读出 Caspase-9 和 Caspase-3 检测样本在 405 nm 的数值; Caspase-8 在 505 nm 的数值. 收集 2×10^6 待检细胞加冷 PBS 2 mL 于细胞沉淀, 混匀, 2 000 r/min, 离心 10 min, 弃上清, 加入含蛋白酶抑制剂的三倍体积的细胞胞质抽提缓冲液(Sucrose 250 mmol/L; HEPES (pH 7.5) 20 mmol/L; KCl 10 mmol/L; MgCl_2 1.5 mmol/L; EDTA 1 mmol/L; EGTA 1 mmol/L; Dithiothreitol 1 mmol/L), 冰上孵育 30 min, 玻璃匀浆器匀浆, 匀浆液用 750 g, 4 °C, 离心 10 min, 吸取上清液, 以 4 °C, 12 000 g 离心 30 min, 收集上清液于另一无菌塑料离心管. 用 BCA 检测法测定标本

中蛋白质含量. 取 20 μg 蛋白质于 12 % SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 1 h 后, 转移到硝酸纤维素薄膜上, 加入含 50 g/L 低脂奶粉的 PBST(磷酸缓冲液 + 1 g/L 吐温 -20) 封闭液 20 mL 室温下振荡 2 h. 再将膜放入另一干净容器内, 加入含 5 % 低脂奶粉的小鼠抗细胞色素 C 单克隆抗体(1 : 1 000)的新鲜孵育液, 4 °C 轻轻振荡过夜, 弃一抗孵育液, 用 PBST 室温下漂洗, 将膜再转移到另一干净容器内, 加入含辣根过氧化物酶标记的抗免疫球蛋白(1 : 2 000)封闭液, 室温下振荡孵育 2 h, 取膜, 以 PBST 室温下漂洗. 最后用增强化学发光法显示检测蛋白质条带.

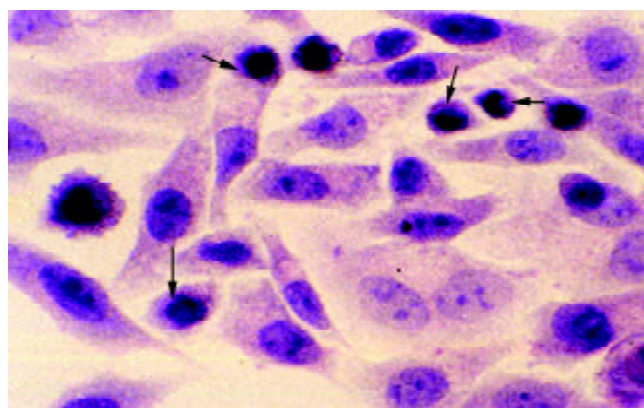
统计学处理 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 Statpal 软件包分析.

2 结果

2.1 TDCA 诱导 HepG2 细胞凋亡 细胞爬片固定后经 HE 染色显示, TDCA 400 $\mu\text{mol/L}$ 孵育 12 h, 可见明显的凋亡细胞(图 1). 电镜主要是对细胞核进行观察, 从亚细胞结构上证实细胞凋亡的存在, 核致密化是凋亡最具特征性的变化, TDCA 400 $\mu\text{mol/L}$ 孵育 12 h, 可见典型的凋亡细胞核改变(图 2). TDCA 400 $\mu\text{mol/L}$ 与 HepG2 细胞孵育 12 h 可诱导显著的细胞凋亡, 流式细胞仪检测细胞凋亡率为 $50.4 \pm 2.2 \%$, 与对照组($2.1 \pm 0.2 \%$) 相比具有显著性差异($t = 36.1$, $P = 0.0008$).

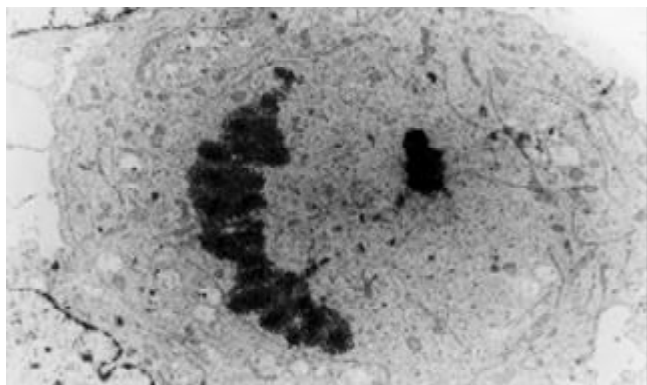


A: 对照组.



B: TDCA 组 细胞明显皱缩、呈圆形或不规则形, 核染色质致密、边聚, 呈蓝黑色等凋亡形态.

图 1 凋亡细胞形态学改变 HE $\times 40$



A: 对照组.

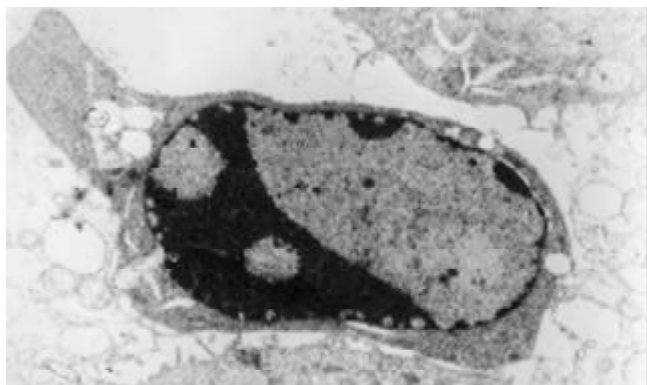
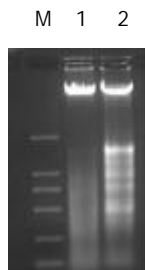
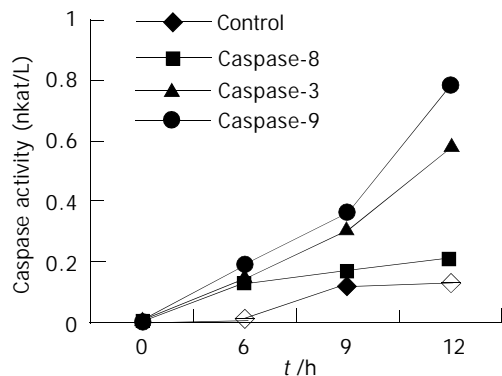
B: TDCA 组典型的凋亡小体结构.
图2 凋亡细胞核的形态改变 EM $\times 5\,000$.M: Marker; 1: Control; 2: TDCA
图3 DNA凝胶电泳显示: TDCA 组, 可见明显的DNA Ladder.

图4 Caspase 蛋白酶活性.

2.2 细胞凋亡的生物化学检测 DNA Ladder 是凋亡在生化方面最重要、也是最具特征性的表现之一. 细胞经 TDCA 400 $\mu\text{mol/L}$ 孵育 12 h, 通过凝胶电泳证实有明显的 DNA Ladder (图3). 在 TDCA 诱导 HepG2 细胞凋亡

过程中, Caspase-8、Caspase-9、Caspase-3 蛋白酶活性呈时间依赖性增高, 以 Caspase-9 和 Caspase-3 增高显著, 12 h 活性最高 ($t_9=13.0$, $P=0.0059$; $t_3=16.88$, $P=0.0035$), 与对照相比, Caspase-8 活性仅轻度增高 ($t=1.94$, $P=0.1917$, 图4). 在 TDCA 诱导 HepG2 细胞凋亡过程中, 采用免疫印迹法在细胞胞质内检测到细胞色素 C, 并且发现线粒体释放细胞色素 C 呈时间依赖性增加, 12h 最明显(图5).

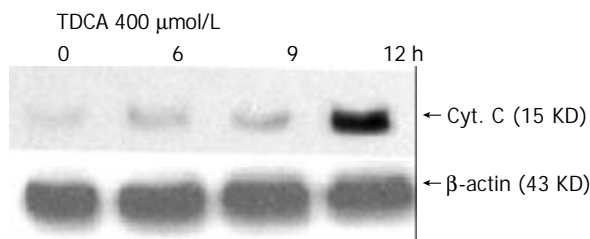


图5 TDCA 对线粒体细胞色素 C 释放的作用(免疫印迹法).

3 讨论

大量研究表明疏水性胆汁酸在体内外均可诱导肝细胞凋亡, 且诱导细胞凋亡的浓度明显低于其引起细胞坏死的浓度. 事实上, 在大多数胆汁淤积症中, 疏水性胆汁酸诱导肝细胞凋亡比其引起肝细胞坏死更多见^[4, 9-12]. 凋亡是一种细胞死亡方式, 我们从形态学及生化学方面证实 TDCA 400 $\mu\text{mol/L}$ 与 HepG2 细胞孵育 12 h 可诱导显著的细胞凋亡^[13], 表现为细胞皱缩、变圆、贴壁不牢固, 核染色质致密、边聚、凋亡小体形成及 DNA 凝胶电泳呈现凋亡所特有的 DNA Ladder; 经流式细胞仪检测死亡率为 50.4 %.

细胞色素 C 释放被认为是凋亡过程中的关键事件^[14-18]. 线粒体细胞色素 C 可通过调控细胞能量代谢决定受刺激细胞是发生凋亡还是坏死. 细胞色素 C 从线粒体易位到胞质是凋亡特异性蛋白酶 procaspase-9 活化的前提^[19-21]. 在 TDCA 诱导 HepG2 细胞凋亡过程中, 我们应用免疫印迹法检测到有细胞色素 C 从线粒体释放到胞质, 且发现线粒体细胞色素 C 释放呈时间依赖性增加, 12 h 最明显, 与细胞凋亡在 12h 显著增高一致; 表明 TDCA 诱导 HepG2 细胞凋亡与线粒体细胞色素 C 释放显著相关, 提示胆汁淤积性肝病中, 肝细胞损伤可能与疏水性胆汁酸损伤线粒体膜, 引起细胞色素 C 释放介导肝细胞凋亡有关.

Caspase 是一类半胱氨酸天冬氨酸特异蛋白酶, 目前已发现 14 种, 分启动 Caspase, 如 Caspase-8, 9, 和效应 Caspase, 如 Caspase-3, 7 两类; 分别参与凋亡的启动和执行过程, 他们的活化是凋亡过程中的关键事件. 不同的细胞凋亡途径, 可活化不同的启动 Caspase^[22-30]. Caspase-8 主要参与死亡受体 (TNF、FasL) 介导细胞凋亡的途径^[31-33], 而 Caspase-9 主要参与由一些凋亡诱导剂诱导线粒体损伤介导细胞凋亡的途径^[34-38]. 在 TDCA 诱导 HepG2 细胞凋亡过程中, 我们检测了三种 Caspase

蛋白酶活性, 三种 Caspase 蛋白酶活性均呈时间依赖性增高, 其中以 Caspase-9 和 Caspase-3 蛋白酶活性升高显著, Caspase-8 活性仅轻度增高. 表明 TDCA 诱导 HepG2 细胞凋亡可能主要是与通过损伤线粒体, 释放细胞色素 C, 从而活化 Caspase-9 途径启动的 Caspase 级联反应有关. TDCA 诱导 HepG2 细胞凋亡可能不依赖 Caspase-8 的活化.

4 参考文献

- 1 李光明, 谢青, 周霞秋. 熊去氧胆酸在慢性肝病中的应用及机制. *肝脏* 2002;7:59-61
- 2 Floreani A, Guido M, Bortolami M, Della Zentil G, Venturi C, Pennelli N, Naccarato R. Relationship between apoptosis, tumour necrosis factor, and cell proliferation in chronic cholestasis. *Dig Liver Dis* 2001;33:570-575
- 3 任可, 徐灿, 金震东, 李兆申. 胆汁淤积性肝病发病的分子学进展. *世界华人消化杂志* 2001;9:811-814
- 4 Kaplowitz N. Cell death at the millennium. Implications for liver diseases. *Clin Liver Dis* 2000;4:1-23
- 5 潘勤, 李定国. 原发性胆汁性肝硬变的发病机制及药物治疗. *世界华人消化杂志* 2000;8:564-566
- 6 Rodrigues CM, Steer CJ. Bile acids and hepatocyte apoptosis: living/leaving life in the Fas lane. *Gastroenterology* 1999;117:732-736
- 7 吕鹏, 罗和生, 余保平. 细胞凋亡与肝脏疾病. *世界华人消化杂志* 2000;8:1157-1159
- 8 李新平, 毛鑫智. 雌激素以及胆酸负荷和胆汁流失对大鼠肝胆功能的影响. *世界华人消化杂志* 2000;8:1009-1012
- 9 Kumar D, Tandon RK. Use of ursodeoxycholic acid in liver diseases. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:3-14
- 10 Rodrigues CM, Steer CJ. The therapeutic effects of ursodeoxycholic acid as an anti-apoptotic agent. *Expert Opin Investig Drugs* 2001;10:1243-1253
- 11 Marzioni M, Glaser SS, Alpini G, LeSage GD. Role of apoptosis in development of primary biliary cirrhosis. *Dig Liver Dis* 2001;33:531-533
- 12 Yerushalmi B, Dahl R, Devereaux MW, Gumprecht E, Sokol RJ. Bile acid-induced rat hepatocyte apoptosis is inhibited by antioxidants and blockers of the mitochondrial permeability transition. *Hepatology* 2001;33:616-626
- 13 李光明, 谢青, 周霞秋, 廖丹. 牛磺酸脱氧胆酸诱导 HepG2 细胞凋亡及坏死的研究. *临床消化病杂志* 2002;14:252-255
- 14 Chen Q, Gong B, Almasan A. Distinct stages of cytochrome c release from mitochondria: evidence for a feedback amplification loop linking caspase activation to mitochondrial dysfunction in genotoxic stress induced apoptosis. *Cell Death Differ* 2000;7:227-233
- 15 Jiang S, Cai J, Wallace DC, Jones DP. Cytochrome c-mediated apoptosis in cell lacking mitochondrial DNA. Signaling pathway involving release and caspase 3 activation is conserved. *J Biol Chem* 1999;274:29905-29911
- 16 Finucane DM, Bossy-Wetzel E, Waterhouse NJ, Cotter TG, Green DR. Bax-induced caspase activation and apoptosis via cytochrome c release from mitochondria is inhibitable by Bcl-xL. *J Bio Chem* 1999; 274:2225-2333
- 17 Nakagawa I, Nakata M, Kawabata S, Hamada S. Cytochrome c-mediated caspase-9 activation triggers apoptosis in *Streptococcus pyogenes*-infected epithelial cells. *Cell Microbiol* 2001;3:395-405
- 18 Gastman BR, Yin XM, Johnson DE, Wieckowski E, Wang GQ, Watkins SC, Rabinowich H. Tumor-induced apoptosis of T cells: amplification by a mitochondrial cascade. *Cancer Res* 2000;15:6811-6817
- 19 Gottlieb RA. Role of mitochondria in apoptosis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2000;10:231-239
- 20 Rocha S, Soengas MS, Lowe SW, Glanzmann C, Fabbro D, Winterhalter K, Bodis S, Pruschy M, Rocha S, Soengas MS. Protein kinase C inhibitor and irradiation-induced apoptosis: relevance of the cytochrome c-mediated caspase-9 death pathway. *Cell Growth Differ* 2000;11:491-499
- 21 Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wang HG, Reed JC, Nicholson DW, Alnemri ES, Green DR, Martin SJ. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol* 1999;144:281-292
- 22 Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407:770-776
- 23 Sun XM, MacFarlane M, Zhuang J, Wolf BB, Green DR, Cohen GM. Distinct caspase cascades are initiated in receptor-mediated and chemical-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1999;274:5053-5060
- 24 Bossy-Wetzel E, Green DR. Caspases induce cytochrome c release from mitochondria by activating cytosolic factors. *J Biol Chem* 1999;274:17484-17490
- 25 Xie Q, Khaoustov VI, Chung CC, Sohn J, Krishnan B, Lewis DE, Yoffe B. Effect of tauroursodeoxycholic acid on endoplasmic reticulum stress-induced caspase-12 activation. *Hepatology* 2002;36:592-601
- 26 Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 2000;403:98-103
- 27 Green DR. Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell* 1998;94:695-698
- 28 Oyadomari S, Araki E, Mori M. Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in pancreatic beta-cells. *Apoptosis* 2002;7:335-345
- 29 Daniel PT. Dissecting the pathways to death. *Leukemia* 2000;14:2035-2044
- 30 Kaufmann SH, Hengartner MO. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol* 2001;11:526-534
- 31 Kruidenier M, Evan GI. Caspase-8 in apoptosis: the beginning of "the end"? *IUBMB Life* 2000;50:85-90
- 32 范学工. 一个新的凋亡分子 - trail. *世界华人消化杂志* 2000;8:84-85
- 33 Stennicke HR, Jurgensmeier JM, Shin H, Devereaux Q, Wolf BB, Yang X, Zhou Q, Ellerby HM, Ellerby LM, Bredesen D, Green DR, Reed JC, Froelich CJ, Salvesen GS. Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *J Biol Chem* 1998;273:27084-27090
- 34 Jiang X, Wang X. Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *J Biol Chem* 2000;275:31199-31203
- 35 Reed JC, Kroemer G. Mechanisms of mitochondrial membrane permeabilization. *Cell Death Differ* 2000;7:1145
- 36 Rodrigues CM, Fan G, Ma X, Kren BT, Steer CJ. A novel role for ursodeoxycholic acid in inhibiting apoptosis by modulating mitochondrial membrane perturbation. *J Clin Invest* 1998;101:2790-2799
- 37 Rodrigues CM, Ma X, Linehan-Stieers C, Fan C, Kren BT, Steer CJ. Ursodeoxycholic acid prevents cytochrome C release in apoptosis by inhibiting mitochondrial membrane depolarization and channel formation. *Cell Death Different* 1999;6:842-854
- 38 Rodrigues CM, Fan G, Wong PY, Kren BT, Steer CJ. Ursodeoxycholic acid may inhibit deoxycholic acid-induced apoptosis by modulating mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen species production. *Mol Med* 1998;4:165-178



Published by **Baishideng Publishing Group Inc**
7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton,
CA 94588, USA
Fax: +1-925-223-8242
Telephone: +1-925-223-8243
E-mail: bpgoffice@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

