基础研究 文章编号:0253-3626(2010)11-1662-03

LPS 刺激 SD 大鼠胆管上皮细胞表型转化的动物实验研究

王麦建[1],杨雪峰[2],周廷梅[1],余得刚[1],江 燕[2],王曙光[2],赵礼金[1]

(1.遵义医学院附属医院肝胆外科,遵义 563003;2.遵义医学院附属医院胃肠外科,遵义 563003;3.第三军医大学全军肝胆病研究所,重庆 400038)

【摘 要】目的:探讨上皮标志物上皮性钙粘附蛋白(E-cadherhin)和间叶标志物波形蛋白(Vimentin)在脂多糖(Lipopolysacoharides,LPS)诱导的 SD 大鼠胆管上皮细胞中的表达及其意义。方法:选用 SD 大鼠作为研究对象,用 LPS(2 μg/ml)刺激其胆管,用免疫组化方法检测 E-cadherin 和 Vimentin 在胆管细胞中的表达情况。结果:SD 大鼠胆管上皮细胞经 LPS 刺激后,E-cadherin 蛋白表达逐渐缺失($P<0.05$),而 Vimentin 蛋白出现阳性表达($P<0.05$)。结论:LPS 刺激可使 SD 大鼠胆管上皮细胞发生上皮细胞间质转型(Epithelial-mesenchymal transitions,EMT)。

【关键词】胆管上皮细胞;脂多糖;转化;上皮性钙粘附蛋白;波形蛋白;上皮细胞间质转型

【中国图书分类法分类号】R657.4 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-05-10

Reseach of epithelial-mesenchymal transitions in bile duct epithelial cells of SD rats induced by LPS

WANG Mai-jian, et al

(*Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital of Zunyi Medical College*)

【Abstract】*Objective*: To explore the expression and importance of epithelial marker E-cadherhin and mesenehymal marker Vimentin in the bile duct epithelial cells induced by LPS. *Methods*: Epithelia of intrahepatic bile ducts of SD rats were chosen as research subjects, and put into LPS (2 μg/ml). Immunohistochemical technique was applied to detect both the markers of epithelial E-cadherin and mesenehymal Vimentin. *Results*: E-cadherin gradually reduced ($P<0.05$) and Vimentin acquired masculine expression after induction ($P<0.05$). *Conclusion*: Epithelial-mesenehymal transitions happened in the bile duct epithelial cells inducted by LPS.

【Key words】Intrahepatic biliary epithelial cells; LPS; E-cadherin; Vimentin; EMT

原发性肝胆管结石是肝胆系统常见病、多发病之一,其病因及其机制目前还不完全清楚,现有的临床资料和实验研究显示肝胆管结石的发生与胆道系统的感染存在联系。在肝管结石中存在着胆管纤维化,胆管纤维化是肝胆管结石疾病的基本病理生理过程,但形成的机制不清楚。新的研究发现了基质生成细胞来源异质性的证据,肝细胞和胆管上皮细胞也可能通过上皮细胞间质转型(Epithelial-mesenchymal transitions,EMT)成为其主要来源之一[1,2]。EMT 是一种基本的生理病理现象,是指各种损伤因素下上皮细胞逐渐失去原有的上皮细胞特性而获得间叶细胞特性,是器官间质化纤维化进展的重要机制之一[3]。本研究设想,在肝胆管结石病中,由于胆道的感染因素,可能也存在着胆管上皮细胞发生 EMT。为了检验设想,通过脂多糖(Lipopolysacoharides,LPS)(内毒素,是革兰阴性菌外膜的重要组成部分,具有广泛的生物学活性[4])刺激 SD 大鼠胆管上皮细胞,用免疫组化方法检测上皮性钙粘附蛋白(E-cadherin)和波形蛋白(Vimentin)的表达情况,来探讨 LPS 能否刺激 SD 大鼠胆管上皮细胞发生 EMT,以期为胆道纤维化疾病的防治提供有益线索。

作者介绍:王麦建(1982-),男,住院医师,硕士,研究方向:普通外科学。

通讯作者:赵礼金,男,主任医师,E-mail:Ljinzhao29@sina.com。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

健康雄性 SD 大鼠 60 只,体重(200±10)g,购自第三军医大学大坪实验动物中心,饲养于恒温、清洁环境,维持 12 h 昼夜节律,遵守实验动物使用及管理。单克隆小鼠抗大鼠 E-cadherin、Vimentin 一抗购自于美国 Sigma 公司。LPS 购于美国 Sigma 公司。免疫组化检测试剂盒由北京中杉生物公司提供。

1.2 动物实验模型的建立

正常健康 SD 大鼠经乙醚吸入麻醉成功后,固定于手术台上,剪除腹部毛发,常规消毒。在无菌条件下行腹腔正中线切口,长约 2 cm 至剑突下,暴露十二指肠上段和胆总管。

于近肝门处分离肝门静脉与胆总管,剥离胆总管周围组织。胆总管缓慢注入 LPS 约 1 ml(2 μg/ml,生理盐水稀释),空白对照组胆管内注入等量生理盐水。生理盐水冲洗腹腔,常规分层关腹,交饲育员以正常饮水及复合饲料饲养。

术后实验动物分笼饲养。于术后 48、72 h 取肝。取肝时门静脉内缓慢注射生理盐水 5~10 ml 驱肝血，防止肝淤血影响实验结果。待肝脏质地呈均匀之土黄色、基本无血性灌注液流出时开始游离肝脏。

成功取下肝脏后修剪成大小约 5 mm × 5 mm × 5 mm 大小组织块，以 4%多聚甲醛固定，常规脱水、封腊，制备切片[5]。各大鼠肝组织均取自相同部位。

1.3 免疫组化方法

切片组织厚度为 3~5 μm，置于 70℃烤箱 2 h；常规脱蜡至水，PBS 冲洗 5 min × 3 次；3%新鲜双氧水室温孵育 10 min 后，PBS 3 min × 3 次；修复抗原，切片置于 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液（pH 6.0）微波炉煮沸，高热 3 min+ 低热 7 min+ 低热 7 min，放置室温后 PBS 5 min × 3 次，甩干液体；滴加山羊血清，室温封闭 20~30 min，甩干，不洗；滴加 1 抗（小鼠抗大鼠 E-cadherin 1:200；小鼠抗大鼠 Vimentin 1:200），4℃过夜；第 2 d 恢复至室温，滴加 2 抗，37℃孵育 20~30 min，5 min × 3 次；滴加辣根氧化酶，室温孵育 20~30 min，PBS 冲洗 5 min × 3 次；DAB 显色（显色液配制根据说明书），镜下观察染色效果，水洗终止后苏木精复染；脱水透明封片，镜检。以 PBS 代替一抗进行上述染色作为空白对照，结果为阴性。PBS 浓度为 0.01 mol/L。

结果判定：参照 Shimizu[6]等评分方法，每张切片任意选 5 个视野，观察其细胞胞膜及胞浆着色强度，无表达为阴性、阳性颗粒呈浅黄色为可疑阳性、浅棕色为弱阳性、棕黄色为阳性、棕褐色为强阳性。与正常对照组相比较，≤90%的 LPS 刺激后细胞染色被判定为 E-cadherin 表达降低，>90%的细胞染色为 E-cadherin 表达保留。Vimentin 以 >20%胆管上皮细胞的胞浆/胞膜阳性为阳性表达，否则为阴性表达。

1.4 统计学分析

图像分析软件 Imagepro Plus 系统检测免疫组化图像 IOD 值，每例均随机观察 20 个高倍视野进行阳性面积定量分析。SPSS 13.0 分析数据，其组内差异程度用均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示；多组均数间的比较采用单因素的方差分析，$P<0.05$ 判定为有统计学差异；多个样本均数间两两比较采用 SNK 法，$P<0.05$ 判定为有统计学差异；相关性采用分类变量的关联性分析（交叉分类 2 × 2 表的关联性分析），$P<0.05$ 判定为有统计学意义。

2 结 果

2.1 HE 染色

光学显微镜下观察，SD 大鼠肝内胆管由呈立方形或柱状形的胆管细胞排列组成，为单层柱状或立方上皮。经 LPS 刺激后胆管组织周围炎细胞明显浸润（图 2），对照组则无炎细胞浸润（图 1）。

2.2 免疫组化结果

E-cadherin 是重要的上皮细胞的标志物。本实验经免疫组化检测发现，对照组中 E-cadherin 均匀稳定的在细胞膜及细胞浆呈强阳性表达，棕褐色线性或颗粒样染色（图 4）；经 LPS 诱导后 E-cadherin 在细胞膜及细胞浆的表达较对照组部分缺失（图 5）。

Vimentin 是一种间充质细胞的标记分子，主要表达于组织的间质。本实验对 LPS 刺激后的 SD 大鼠肝脏组织的研究发现，Vimentin 在小胆管的细胞浆呈现阳性染色（图 7），棕黄色颗粒状染色。正常 SD 大鼠肝脏组织的上皮内未发现有 Vimentin 的阳性染色（图 6）。

我们通过检测 SD 大鼠肝脏组织的免疫组化 IOD 值，经过 SPSS13.0 分析后发现，随着 LPS 的刺激时间增加，E-cadherin 逐渐缺失或下调，且缺失成都与刺激时间呈正相关。而 Vimentin 经 LPS 刺激后出现阳性表达，见表 1、图 3。

为了探讨 LPS 刺激 SD 大鼠胆管上皮细胞后上皮细胞标记 E-cadherin 的表达变化与间叶细胞标记 Vimentin 之间的关系，我们分析了 60 例标本进行两分类变量的关联性分析。结果发现：有 Vimentin 阳性表达的 22 例组织中 E-cadherin 缺失表达者 14 例，正常表达者 8 例。而在 Vimentin 阴性表达的 38 例组织中 E-cadherin 缺失表达表达者 14 例，正常表达者 24 例。将数据进行 χ^2 检验，检验水准 $\alpha=0.05$，得到 $\chi^2=4.02>3.84$，$P<0.05$；Pearson 列相关系数 $r=-0.46$（ad-bc<0，相关系数为负）。经 LPS 刺激后 E-cadherin 与 Vimentin 的表达呈负相关。见表 2。

3 讨 论

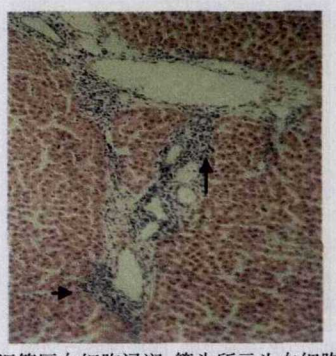
在肝管结石中存在着胆管纤维化，胆管纤维化是肝胆管结石疾病的基本病理生理过程，EMT 可能是纤维化的来源之一。

EMT 发生的特征是细胞上皮标志物缺失同时间叶细胞标志物出现表达。其中 E-cadherin 表达的缺失与 EMT 的发



胆管细胞排列规则，为单层上皮细胞，汇管区无淋巴细胞出现，箭头所示

图 1 正常 SD 大鼠肝内胆管组织（HE × 200）



汇管区白细胞浸润，箭头所示为白细胞

图 2 LPS 刺激 SD 大鼠肝内胆管组织（HE × 200）

表 1 LPS 刺激 SD 大鼠胆管上皮细胞中 E-cadherin/Vimentin 表达($\bar{x} \pm s$)

指标	例数	对照组	实验组	
			LPS 48 h	LPS 72 h
E-cadherin	20	60 364.297 3 ± 3 096.584 2	42 568.665 2 ± 5 741.365 2*	20 136.214 0 ± 3 651.223 7#
Vimentin	20	14 873.197 4 ± 4 195.664 9	40 591.5260 ± 6 890.615 2*	53 782.236 1 ± 5 689.906 9*

*P<0.05 与对照组相比较;# 表示与对照组比较,P<0.01

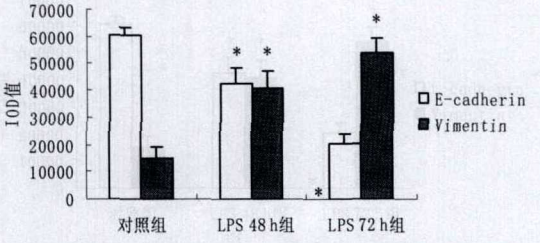
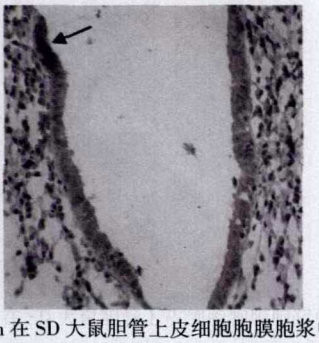
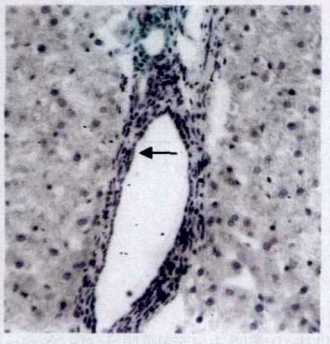


图 3 LPS 刺激 SD 大鼠胆管上皮细胞中 E-cadherin/Vimentin 的表达



E-cadherin 在 SD 大鼠胆管上皮细胞胞膜胞浆中呈棕黄色线性或颗粒样表达,箭头所示

图 4 E-cadherin 在 SD 大鼠胆管上皮细胞中的正常表达(IHC × 200)

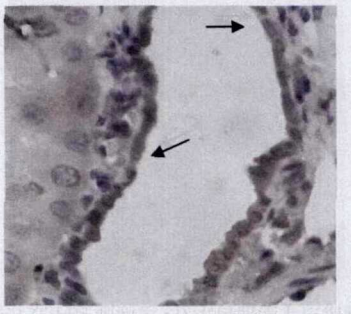


Vimentin 在 SD 大鼠胆管上皮细胞中未见黄色颗粒,箭头所示

图 6 Vimentin 在 SD 大鼠胆管上皮细胞中的表达(IHC × 200)

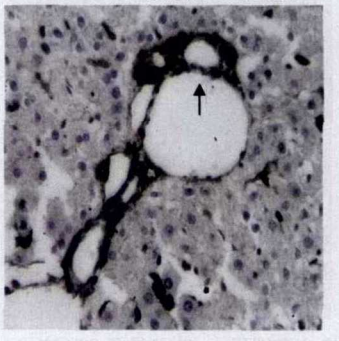
表 2 LPS 刺激 SD 大鼠胆管上皮细胞后 E-cadherin 与 Vimentin 表达的关联性分析

E-cadherin	Vimentin 表达		合计	P 值
	+	−		
+	8	24	32	<0.05
−	14	14	28	
合计	22	38	60	



E-cadherin 在 LPS 刺激后 SD 大鼠胆管上皮细胞胞膜胞浆中黄色颗粒表达部分缺失,箭头所示

图 5 LPS 刺激后 SD 大鼠胆管上皮细胞 E-cadherin 表达(IHC × 200)



Vimentin 在 LPS 诱导后 SD 大鼠胆管上皮细胞胞浆中呈棕黄色颗粒样表达,箭头所示。

图 7 Vimentin 在 LPS 诱导后 SD 大鼠胆管上皮细胞中的表达(IHC × 200)

生具有直接的关系,E-cadherin 是 EMT 发生过程的重要靶分子和中心事件[7]。E-cadherin 是一种重要的上皮细胞标记物,被认为是决定上皮细胞表型的关键分子。

本实验通过免疫组化方法检测 SD 大鼠胆管上皮细胞上皮性标志物 E-cadherin,发现随着 LPS 的刺激上皮性标志物 *E-cadherin* 表达逐渐缺失或下调,并且 *E-cadherin* 表达下调的程度与 LPS 刺激时间呈负相关。说明在感染因素的条件下,胆管细胞的上皮特性逐渐消失。E-cadherin 的缺失可导致细胞间紧密连接破坏,导致细胞间粘附力降低。

同时在对 Vimentin 的免疫组化检测发现,同 E-cadherin 相反,随着 LPS 的刺激,Vimentin 的表达出现上调。说明在感染因素的条件下,胆管细胞的上皮逐渐表达出间质特性。新近的研究表明 Vimentin 的表达可能是 EMT 的发生的结果。

为了阐述间质性 Vimentin 的上调与上皮性 E-cadherin 的缺失的关系。本课题对 SD 大鼠胆管经 LPS 刺激后 E-cadherin 与 *Vimentin* 的相关性进行了分析,结果提示经 *LPS* 刺激后 E-cadherin 与 Vimentin 的表达呈负相关,即伴随着 E-cadherin 的下调 Vimentin 的表达出现上调。伴随着上皮特性的逐渐缺失出现间叶特性逐渐表达。

本课题研究用免疫组化来探讨 LPS 对胆管上皮细胞表

基础研究 文章编号:0253-3626(2010)11-1665-03

MNU 诱导大鼠膀胱癌的机制研究

陈 刚[1],张 尧[1],敖 鹏[1],罗春丽[2],吴小候[1]

(1. 重庆医科大学附属第一医院泌尿科;2. 重庆医科大学检验系国家重点实验室;重庆 400016)

【摘 要】目的:研究 N-甲基-N-亚硝基脲(N-methyl-N-nitrosourea,MNU)诱导膀胱癌发生的机制。方法:60 只 SD 大鼠随机分成实验组和对照组。实验组用 MNU 2 mg/次,2 周 1 次定期作膀胱内灌注,共 4 次。对照组膀胱内灌以生理盐水 0.2 ml/次,每 2 周 1 次,共 4 次。第 9 周未处死大鼠,随即取大鼠膀胱放入 -80℃液氮中保存。采用免疫组化检测 H-Ras 蛋白的表达,RT-PCR 检测磷脂酶 C ε(PLC ε)mRNA 的表达。结果:实验组 50 只 SD 大鼠 36 只成瘤,4 只大鼠死亡,成瘤率为 81.82%。对照组 10 只大鼠膀胱未见明显变化。免疫组化检测实验组 36 只成瘤大鼠中 32 只 H-Ras 蛋白阳性。对照组大鼠膀胱组织中 H-Ras 蛋白表达阴性。RT-PCR,检测实验组和对照组大鼠膀胱 PLC ε 的表达。实验组 36 只成瘤大鼠 PLC ε 阳性,对照组 PLC ε 表达阴性。结论:MNU 可诱导大鼠膀胱黏膜发生癌变,其可能机制为引起 H-Ras 基因突变并且过表达,同时引起 PLC ε mRNA 表达增加。

【关键词】N-甲基-N-亚硝基脲;膀胱癌;机制;H-Ras;PLC ε

【中国图书分类法分类号】R737.14 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-06-25

The mechanism of MNU derived rat bladder cancer

CHEN Gang, et al

(*Department of Urology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the mechanism of N-methyl-N-nitrosourea (MNU) derived bladder cancer. *Methods*: 60 SD Rats were devided into experimental group and control group at random. NMU was used to intravesical perfuse per 2 weeks at the dose of 2 mg for 8 w in experimental group, while saline was used

作者介绍:陈 刚(1985-),男,硕士,
研究方向:泌尿系肿瘤的治疗。

通讯作者:吴小候,男,教授,E-mail:wuxiaohou80@hotmail.com。

型转化的影响,结果证实在 LPS 诱导后 BEC 表达了间叶细胞标志物,即发生了 EMT。

新的研究还发现上皮细胞发生 EMT 后有几个不同转归:维持 MFB 表型;维持成纤维细胞表型;凋亡;逆转,即重新转分化为正常上皮细胞[8,9]。可逆性是 EMT 的一个重要特征,在适宜的微环境条件下,经 EMT 所形成的间质细胞又可重新转化为具有正常形态和功能的上皮细胞,这一现象又称间质-上皮转化(Mesenchymal-epithelial transition,MET)[10]。即肝内胆管及其组成成分肝内胆管上皮细胞损伤消失后,经恰当治疗,部分胆管消失区又可重现具有正常结构和功能的肝内胆管。因此 EMT 可逆性及发生 EMT 的细胞存在凋亡现象的发现为纤维化相关疾病的治疗带来了新的希望,如果以 EMT 逆转以及以发生 EMT 的细胞凋亡为分子靶点进行干预,可能是提高治疗效果的有效策略。

参 考 文 献

[1] Strutz F, Okada H, Neilson E G. The role of the tubular epithelial cell in renal fibrogenesis[J]. Clin Exp Nephrol, 2001, 5(3): 62-74.

[2] Savager P. Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition[J]. Bioessays, 2001, 23(2): 912-923.

[3] Rygiel K A, Robertson H, Marshall H L, et al. Epithelial-mesenchymal transition contributes to portal tract fibrogenesis during human chronic liver disease[J]. Laboratory Investigation, 2008, 88(2): 112-123.

[4] 陈丽萍,郭毅武.STAT3 活化在脂多糖刺激大鼠胆管上皮细胞增殖中的作用[J].中国病理生理杂志,2007,23(5):921-925.

[5] 苏钢强,徐志海,邹移海.实验动物学[M].科学出版社,2007.55-79.

[6] Shi Y Y, Nacamuli R P, Salim A, et al. The osteogenic potential of adipose-derived mesenchymal cells is maintained with aging[J]. Plast Reconstr Surg, 2005, 116(16): 1686-1696.

[7] Thiery J P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. Nat Rev Cancer, 2002, 2: 442-454.

[8] Hugo H, Ackland M L, Blick T, et al. Epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions in carcinoma progression[J]. J Cell Physiol, 2007, 213(2): 374-383.

[9] Rubio D, Garcia S, De la Cueva T, et al. Human mesenchymal stem cell transformation is associated with a mesenchymal-epithelial transition [J]. Exp Cell Res, 2008, 314(4): 691-698.

[10] Vincan E, Brabletz T, Faux M C, et al. A human three-dimensional cell line model allows the study of dynamic and reversible epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transition that underpins colorectal carcinogenesis[J]. Cells Tissues Organs, 2007, 185(1): 20-28.

(责任编辑:冉明会)