基础研究 文章编号:0253-3626(2009)12-1632-04

胆总管结扎对小鼠肝脏炎症和细胞凋亡的影响

董玉芳,文阳安,周倩云,罗 丹,张莉萍
(重庆医科大学附属第一医院检验科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨胆总管结扎引起的胆汁淤积对小鼠肝脏细胞凋亡和炎性细胞浸润的影响。方法:采用胆总管结扎手术制备胆汁淤积小鼠模型;利用全自动生化分析仪检测小鼠血清肝脏生化指标水平;用末端核苷酸转移酶介导的脱氧三磷酸尿苷原位缺口末端标记法(Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dutp nick end labeling, TUNEL)检测小鼠肝脏细胞凋亡;用实时荧光定量 PCR 和免疫组织化学方法检测肝脏炎症相关基因表达情况。结果:通过胆总管结扎手术成功制备了梗阻性胆汁淤积小鼠模型;小鼠血清生化指标结果表明小鼠肝脏功能受损,胆总管结扎手术成功;胆总管结扎引起胆汁淤积后,肝脏细胞凋亡和坏死明显增加,炎症细胞浸润增强。结论:胆汁淤积导致肝脏细胞凋亡、坏死和炎症活动增强是胆总管结扎致肝纤维化过程中的重要表现。

【关键词】胆总管结扎;胆汁淤积;细胞凋亡;炎症细胞浸润
【中国图书分类法分类号】R575.2+2 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-05-26

Impact of bile duct ligation on hepatocytic apoptosis and inflammation in mice

DONG Yu-fang, et al
(*Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of bile duct ligation-induced biliary cholestasis on liver of mice. *Methods*: Mice were subjected to bile duct ligation to establish the cholestasis model. Serum hepatic biochemical indicators were detected with automatic biochemistry analyzer; hepatocytic apoptosis was evaluated by TUNEL; real-time PCR and immunohistochemisty were employed to detect the expression of inflammation-related genes. *Results*: An obstructive cholestasis mouse model was successfully established. Increased serum biochemical indicator indicated impaired liver function in bile duct-ligated mice. Hepatocytic cells apoptosis and inflammatory cell infiltration increased significantly after obstructive cholestasis. *Conclusion*: Cholestasis induced by bile duct ligation promoted the hepatocytic apoptosis and inflammatory cell infiltration in liver.

【Key words】Bile duct ligation; Cholestasis; Cell apoptosis; Inflammatory cell infiltration

胆总管梗阻引起的黄疸在临床上非常常见。目前,手术治疗仍然是首选的治疗方案之一。然而,手术前已经存在的黄疸通常伴随着肝细胞损伤和肝脏功能异常,并导致术后较高的死亡率[1]。胆汁淤积引起肝脏损伤的病理过程复杂,且目前尚未完全研究清楚,可能主要涉及化学因子、有毒胆汁酸、炎症细胞、活性氧、内毒素血症等因素的相互作用[2,3]。其中,胆汁淤积引起的肝脏细胞凋亡和坏死以及炎症细胞浸润是重要病理变化之一。本文通过制备胆总管结扎小鼠模型,探讨了胆汁淤积对肝脏细胞凋亡和炎性浸润的影响,为梗阻性胆汁淤积致肝脏病理变化研究提供了实验基础。

作者介绍:董玉芳(1983-),女,硕士,
研究方向:感染性疾病的研究。
通讯作者:张莉萍,女,教授,E-mail:zhangliping2005@yahoo.com.cn。
基金项目:国家自然科学基金(编号:30670965);教育部重点课题(编号:207099);重庆市科委(编号:CSTC,2006BB5030)。

1 材料与方法

1.1 材料

2~8 周龄 SPF 级 BALB/c 小鼠,体重 20~25 g,购于重庆医科大学实验动物中心。肝脏生化指标检测试剂盒购于日本和光公司。EDTA 修复液、SP 试剂盒、浓缩型 DAB 显色试剂盒、防脱玻片购于北京中杉,多聚甲醛购于 Sigma 公司。TUNEL 试剂盒为武汉博士德生物工程有限公司产品。RNA latter 为德国 Qiagen 公司产品。RNA 提取试剂盒(Rneasy Mini Kit)为德国 Qiagen 公司产品。PrimeScript RT 试剂盒购

于 TaKaRa 公司。Brilliant SYBR Green QPCR 试剂盒购自 Stratagene 公司。羊抗 ICAM-1 多克隆抗体为 Santa Cruz 公司产品;兔抗 MPO 多克隆抗体为 NeoMarkers 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 胆总管结扎小鼠模型的建立 小鼠随机分为 2 组:胆总管结扎(Bile duct ligation,BDL)组和假手术(Sham operation,sham)对照组。胆总管结扎组小鼠腹部皮肤常规消毒后,沿腹正中线剪开,暴露胆总管,将胆总管远、近端结扎,关腹;假手术组仅开腹并游离胆总管而不结扎,而后关腹。具体操作参考文献[4]。

1.2.2 血清学生化指标检测 小鼠胆总管结扎后 1、3、5、7、14 d 集小鼠静脉血,进行血清 ALT、AST、ALP、TB、DB、CRP 等生化指标检测,同时以假手术后 2 周的小鼠作为对照,采用 OLYMPUS AU5400 全自动生化分析仪按照试剂盒说明书进行测定。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 根据 GenBank 中小鼠的 KC-1、MIP-2、ICAM-1、Foxj1 和 TBP(TATA box binding protein)基因序列设计合成 PCR 引物,序列见表 1。提取组织总 RNA,进行逆转录合成 cDNA,反应体系如下:5 × PrimeScriptTM Buffer 2 μl、PrimeScriptTM RT Enzyme Mix I 0.5 μl、Oligo dT 引物(50 μmol/L)0.5 μl、总 RNA 500 ng、补水至 10 μl。吹打混匀后 42℃ 15 min,85℃ 5 min。获得的 RNA 进行 real-time PCR,反应条件如下:10 μmol/L 引物 10 μl、cDNA 模板 1 μl、SYBR Green:Rox 9 μl。循环参数为:95℃10 min,40 循环 95℃(30 s),55℃(1 min),72℃(1 min),所有反应重复 3 次。每个基因的表达水平用 TATA 结合蛋白 TBP (TATA-box binding protein)的表达水平作为内参照。

1.2.4 免疫组织化学染色 步骤如下:①脱蜡和水化;②抗原修复;③内源性生物素封闭;④封闭内源性过氧化物酶;⑤用正常血清工作液封闭 10 ~ 15 min;⑥加 1%BSA 稀释的相应的一抗,37℃孵育 60 min 或 4℃过夜 (湿盒),PBST 漂洗 5 min,3 次;⑦加相应的生物素化的二抗,37℃孵育 10 ~ 15 min (湿盒),PBST 漂洗 5 min,3 次;⑧加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素工作液 37℃15 min,PBST 漂洗 5 min,3 次;⑨DAB 显色:将现配好的显色液滴加到切片上,镜下观察到阳性出现即可终止反应,蒸馏水冲洗。复染 3 min,水洗后迅速浸入酸性酒精中 1 s 分化,水洗。切片干后用二甲苯透明,中性树胶封片。

1.2.5 细胞凋亡检测 采用 TUNEL 方法检测细胞凋亡,步骤如下:切片常规脱蜡至水,用 4%多聚甲醛室温下固定 30 min,标本片加 TBS 1/100 新鲜稀释,用蛋白酶 K 37℃消化,加标记缓冲液,按每张切片取 TdT 和 DIG-d-UTP 各 1 μl,加入 18 μl 标记缓冲液中混匀,用封闭液 1/100 稀释生物素化抗地高辛抗体,加至标本片上,于湿盒中 37℃反应 30 min,加封闭液,DAB 显色 20 min。水洗,苏木素轻度复染,镜下观察。细胞核中有棕黄色颗粒者为即凋亡细胞。

1.2.6 统计学分析 所有数据用均数 ± 标准差表示,采用 t 检验或者单因素方差分析(One-way ANOVA Analysis),数据处理使用 SPSS 11.5 软件。$P<0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 胆总管结扎引起胆汁淤积对小鼠肝脏功能的影响

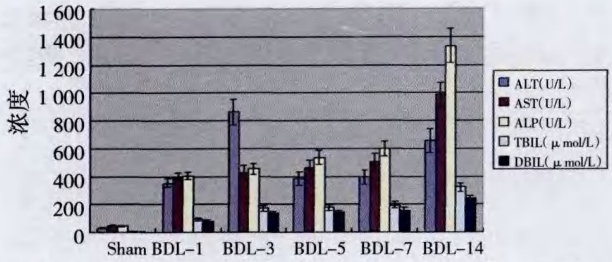
小鼠经胆总管结扎后,血清谷草转氨酶、谷丙转氨酶、碱性磷酸酶、总胆红素和直接胆红素水平均明显升高,与假手术小鼠相比,各指标均具有显著性差异($P<0.01$)。其中,ALT 在结扎后 3 d 升高最明显,其他各指标随着结扎时间延长呈时间依赖性增高(图 1)。

2.2 胆汁淤积引起肝脏组织细胞坏死和凋亡

典型的细胞死亡主要有 2 种方式,即坏死和凋亡。胆总管结扎 2 周后,TUNEL 结果显示凋亡细胞胞核固缩,染色质边聚,胞核染成棕黄色,与假手术组相比,胆总管结扎小鼠肝组织中 TUNEL 染色阳性的凋亡细胞明显增多(图 2)。同时,小鼠肝脏经 HE 染色后观察组织病理学变化,假手术组小鼠未见肝脏细胞坏死和炎症细胞浸润,肝小叶结构正常。而胆总管结扎 2 周后的小鼠肝脏汇管区、肝小叶周边炎性细胞浸润明显;可见肝细胞的坏死灶;增生的小胆管和纤维母细胞、胶原纤维形成间隔,分割、改建原有的肝小叶,使残存肝细胞形成大小不一的岛状结构,肝脏组织学结构明显改变(图 3)。

表 1 基因的引物序列

基因名称	引物序列
TBP	F:5'-CTGCTGTTGGTGATTGTTGGT-3'
	R:5'-CGGAATGTATCTGGCACAAAA-3'
KC-1	F:5' -TGGGATTCACCTCAAGAACA-3'
	R:5'-TGGGGACACCTTAGCATC-3'
MIP-2	F:5'-TTTTCTGTAAGCCCCGAGAAG-3'
	R:5'-CAATTGCTAAACGAGGCACTG-3'
ICAM-1	F:5'-CTAAGAGGACTCGGTGGATGG-3'
	R:5'-GGGGACAATGTCTCAGCTTTC-3'
Foxj1	F:5'-CAGTGTGGGTGCCTTCTTGTA-3'
	R:5'-CTTCTCGGCTTGGATATGAGG-3'



与假手术小鼠(Sham)相比,胆总管结扎手术小鼠(BDL)各种肝生化指标均明显升高,结果差异具有统计学意义($P<0.01$)

图 1 小鼠胆总管结扎术后肝脏血清学指标变化

2.3 胆总管结扎引起胆汁淤积对小鼠肝脏炎症浸润的影响

采用 Real-time PCR 检测假手术组和胆总管结扎组肝组织中与炎症反应相关的蛋白,如 KC-1、MIP-2 和 I-CAM-1 的 mRNA 表达水平。如图 4 所示,胆总管结扎小鼠肝组织中 KC-1、MIP-2 和 ICAM-1 3 个基因的 mRNA 表达水平均明显增高,与假手术组相比,结果具有显著性差异($P<0.05$)。

同时,抗 ICAM-1 及抗 MPO 免疫组织化学染色结果显示,小鼠胆总管结扎后 2 周后的小鼠肝组织中 ICAM-1 和 MPO 染色阳性的棕褐色细胞明显增多(图 5、6)。

2.4 小鼠胆总管结扎引起胆汁淤积对其他炎症和免疫学指标的影响

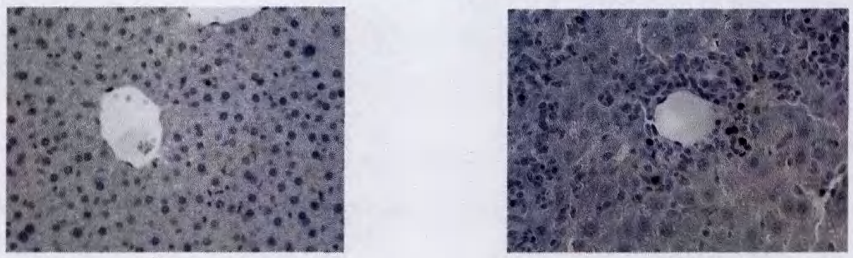
小鼠经胆总管结扎后,分别于术后 1、3、7、14 d 取血清测定 C 反应蛋白水平,测定结果表明假手术小鼠在各个时间点的 C 反应蛋白水平均低于仪器最低检测限(1 mg/L)。而与之相比,胆总管结扎后的小鼠 C 反应蛋白水平明显升高(均大于 1 mg/L,平均值为 1.68 mg/L)。结果说明胆总管结扎引起的胆汁淤积导致了 C 反应蛋白的水平升高,可能与肝脏炎症有着密切关系。

作为 FOX 家族的一员,Foxj1 与炎症和免疫也有着密切关系,本实验采用 Real-time PCR 检测假手术组和胆总管结扎组肝组织中 Foxj1 的 mRNA 表达水平。如图 7 所示,胆总管结扎小鼠肝组织中 Foxj1 的 mRNA 表达水平均明显增高,与假手术组相比,结果差异具有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨 论

梗阻性胆汁淤积是一个包含多种病理变化的复杂过程,其中胆汁淤积引起的肝脏细胞坏死和凋亡以及炎症细胞浸润是其中重要的病理变化之一。本研究中,为了探讨梗阻性胆汁淤积引起的肝脏损伤及组织病理学变化,我们建立了胆总管结扎小鼠模型。通过胆总管结扎可扰乱肝脏胆道系统,引起梗阻性胆汁淤积。当胆汁淤积持续达 2 周以后,胆管壁将变薄变硬,肝细胞间隙连接消失,局部上皮细胞发生坏死[5]。这些病理变化最终导致疏水性胆汁酸等有毒物质的泄漏,从而引起肝脏损伤。

我们的研究结果发现,进行胆道干预后,肝脏功能出现异常,主要表现为血清生化指标,如 ALT、AST、ALP、TBIL 和 DBIL 的明显升高。表明胆总管结扎引起的胆汁淤积导致了严重的肝脏损害。伴随着肝脏功能受损,肝脏组织结构也发生明显变化,同时肝组织细胞出现坏死和凋亡,这也是胆汁淤积引起肝脏结构受损的表现。其中的机制非常复杂,涉及到有毒胆汁酸、活性氧、白细胞等因素的相互作用[6,7]。肝组织



Sham BDL

凋亡细胞表现为胞核固缩,染成棕黄色,染色质边聚。与假手术对照(sham)相比,胆总管结扎小鼠(BDL)肝组织中 TUNEL 染色阳性的凋亡细胞明显增多

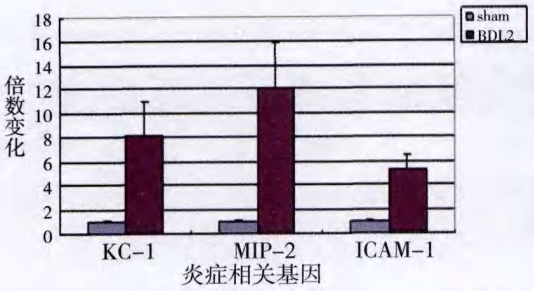
图 2 肝脏组织 TUNEL 染色(×200)



Sham BDL

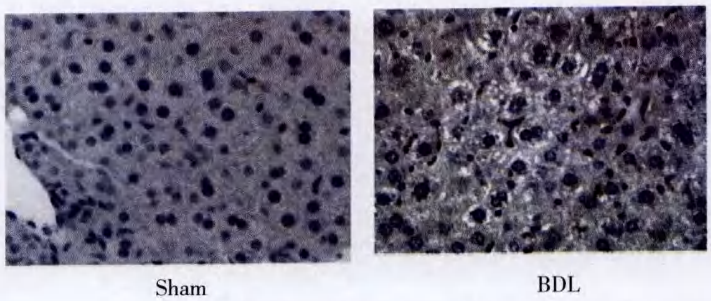
胆总管结扎术(BDL)后,小鼠肝脏的正常肝脏结构消失,可见广泛的肝细胞坏死和明显炎症细胞浸润。而假手术(sham)小鼠的肝脏则无明显变化

图 3 胆总管结扎手术后小鼠肝脏组织病理学变化(HE 染色,×200)



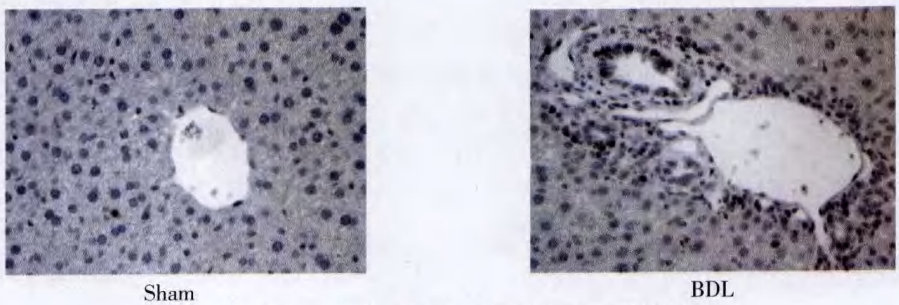
与假手术(sham)小鼠相比，胆总管结扎(BDL)小鼠肝组织中 KC-1、MIP-2 和 ICAM-1 的表达水平均明显增高，结果差异具有统计学意义($P<0.05$)

图 4　实时荧光定量 PCR 分析 KC-1、MIP-2 和 ICAM-1 表达



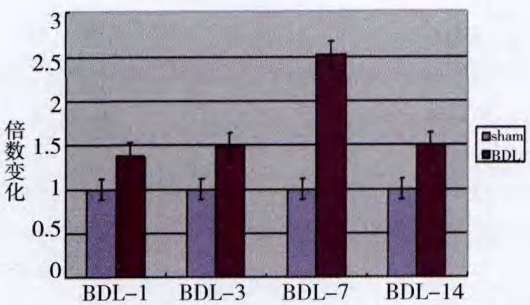
与假手术(sham)小鼠相比，胆总管结扎(BDL)小鼠肝组织中 ICAM-1 的表达水平均明显增高

图 5　ICAM-1 免疫组化染色(×400)



与假手术(sham)小鼠相比，胆总管结扎(BDL)小鼠肝组织中 MPO 的表达水平均明显增高

图 6　MPO 免疫组化染色(×200)



与假手术(sham)小鼠相比，胆总管结扎(BDL)小鼠肝组织中 Foxj1 的表达水平均明显增高，结果差异具有统计学意义($P<0.05$)

图 7　实时荧光定量 PCR 分析 Foxj1 基因表达

炎症细胞浸润是其中重要因素之一。

肝脏炎症反应是由于趋化因子 KC-1、巨噬细胞炎症蛋白 -2(Macrophage inflammatory peptide-2，MIP-2)等以及细胞膜表达细胞间粘附分子 -1(Intercellular adhesion molecule，ICAM-1)等细胞因子分泌增加，引起了肝组织中性粒细胞等炎性细胞浸润，进而导致肝细胞的损害[6~8]。我们的研究结果表明假手术对照组无 ICAM-1 的表达，而在胆总管结扎模型组中，在肝血管内皮细胞、肝窦内皮细胞等处可见大量棕色阳性细胞；实时荧光定量 PCR 结果亦表明，胆总管结扎小鼠 KC-1、MIP-2 和 ICAM-1 的表达增高，肝脏炎症细胞浸润增强。髓过氧化物酶(Myeloperoxidase，MPO)是中性粒细胞嗜天青颗粒所释放的一种重要的过氧化物酶类，存在于线粒体和溶酶体中，主要功能是破坏生物氧化过程中生成的有害的过氧化物，使其放出氧，与炎症反应的氧化吸收过程有关，它既能间接反映中性粒细胞的数量，又能反映其激活的程度。胆总管结扎小鼠肝组织中 MPO 阳性细胞明显增多。以上结果表明，在胆汁淤积形成过程中，趋化因子和细胞因子的分泌和表达增高以及炎症细胞浸润，是进一步导致肝脏损伤重要因素。

C 反应蛋白(C-reactive protein，CRP)是一种能与肺炎链球菌 C 多糖反应的急性时相反应蛋白，是机体组织损伤和非特异炎症反应的敏感标志物。在病毒或细菌感染、梗死等因素引起的组织损伤或炎症过程中，CRP 显著增加。小鼠胆总管结扎后，血清 CRP 水平明显升高，提示胆汁淤积导致了肝脏损伤和炎症发生。同时也提示血清 CRP 水平可以作为胆汁淤积性肝损伤的辅助诊断指标之一。作为 FOX 基因家族的一员，Foxj1 与炎症和免疫也有着密切关系，主要参与免疫调节和炎症反应[9~11]。本研究中，与假手术组相比，胆总管结扎小鼠的 Foxj1 表达水平明显升高，说明小鼠的炎症和免疫状态发生了改变，而其中的具体机制尚有待进一步探讨。

综上所述，小鼠胆总管结扎引起的梗阻性胆汁淤积对小鼠肝脏功能、肝脏组织细胞的凋亡和坏死、组织结构的改变等产生了重要的影响。同时引起肝脏炎症细胞的浸润增加，这与肝脏的损伤具有密切关系。本研究对于全面了解胆汁淤积对肝脏的影响以及对于梗阻性胆汁淤积的诊断和治疗具

基础研究 文章编号:0253-3626(2009)12-1636-04

mdr1C3435T 基因多态性与卵巢癌遗传易感性关系研究

马丽芳[1],周 琦[1],徐建业[1],李少林[2]

(1. 重庆市肿瘤研究所妇瘤科,重庆 400030;2. 重庆医科大学基础医学院放射医学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨 mdr1 基因多态性与卵巢癌遗传易感性的关系。方法:采用病例对照,应用聚合酶链反应 - 限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)技术分析 135 例经病理确诊的卵巢癌病人(病例组)和 146 例同一地区的健康汉族女性(对照组)的 mdr1C3435T 基因型进行对照研究。结果:卵巢癌病例组 C/C 型(30.37%)明显低于对照组(47.95%),而病例组 T/C 型(44.44%)和 T/T 型(25.19%)均明显高于对照组 T/C(38.35%)和 T/T(13.7%),病例组和对照组各基因表型之间差异有显著统计学意义(χ^2= 10.930,P= 0.004)。卵巢癌 mdr1C3435T 基因纯合缺失率(25.19%)高于对照组(13.7%),差异有统计学意义(χ^2 =5.961,P =0.015),与对照组相比,T/T 型患卵巢癌的危险度提高了 2.121 倍。mdr1C3435T 的基因纯合缺失型和非纯合缺失型在病例组与对照组间年龄比较差异均有明显统计学意义(P <0.05),其中在 50 岁以上年龄段,病例组与对照组 mdr1C3435T 的基因纯合缺失率差异有统计学意义(χ^2 =4.984,P =0.026),病例组(20.41%)高于对照组(5.1%),T/T 型患卵巢癌的危险度增加 2.533 倍。结论:mdr1C3435T 基因突变可增加卵巢癌发病风险,mdr1C3435T 基因多态性与卵巢癌遗传易感性密切相关。50 岁以上女性,T/T 型增加卵巢癌的发病风险。

【关键词】卵巢癌;mdr1C3435T 基因多态性;疾病遗传易感性

【中国图书分类法分类号】R730.54; R737.31 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-12-08

Association of single nucleotide polymorphism in mdr1C3435T with susceptibility to ovarian cancer

MA Li-fang, et al

(*Department of Gynecology, Chongqing Canner Research Institute*)

【Abstract】***Objective***: To investigate the association of single nucleotide polymorphism in mdr1C3435T with susceptibility to ovarian cancer. ***Methods***: mdr1C3435T gene was determined by PCR- RFLP method in 135 ovarian cancer patients(cases group) and 146 healthy women(control group). Results: The frequency of C/C genotype in cases group (30.37%) was significantly lower than that in controls(47.95%), and the frequencies of T/C(44.44%)and T/T (25.19%) respectively in cases group were significantly higher than those in controls (T/C38.35%, T/T13.7%). The frequency of

作者介绍:马丽芳(1981-),女,硕士,
研究方向:妇科肿瘤。

通讯作者:周 琦,女,教授,E-mail:qizhou9128@163.com。

基金项目:重庆市卫生局 2007 年度医学科研项目(编号:07-2-191)。

有潜在的临床意义。

参 考 文 献

[1] Tsai Y F, Shyu J F, Chen T H, et al. Effect of preoperative biliary drainage on surgical outcome after pancreaticoduodenectomy[J]. Hepatogastroenterology, 2006, 53(72): 823-827.

[2] Roggin K K, Kim J C, Kurkchubasche A G, et al. Macrophage phenotype during cholestatic injury and repair: the persistent inflammatory response[J]. J Pediatr Surg, 2001, 36(1): 220-228.

[3] Clements W D, Erwin P, McCaigue M D, et al. Conclusive evidence of endotoxemia in biliary obstruction[J]. Gut, 1998, 42(2): 293-299.

[4] Kountouras J, Billing B H, Scheuer P J. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cholestasis in the rat[J]. Br J Exp Pathol, 1984, 65 (3): 305-311.

[5] Duch B U, Andersen H L, Smith J, et al. Structural and mechanical remodeling of the common bile duct after obstruction[J]. Neurogastroenterol Motility, 2002, 14 (2): 111-122.

[6] Gujral J S, Liu J, Farhood A, et al. Functional importance of ICAM-1 in the mechanism of neutrophil-induced liver injury in bile duct-ligated mice[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004, 286(3): 499-507.

[7] Hofmann A F. Cholestatic liver disease: pathophysiology and therapeutic options[J]. Liver, 2002, 22(2): 14-19.

[8] Li Z, Mizuno S, Nakamura T. Antinecrotic and antiapoptotic effects of hepatocyte growth factor on cholestatic hepatitis in a mouse model of bile-obstructive diseases [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007, 292(2): 639-646.

[9] Jonsson H, Peng S L. Forkhead transcription factors in immunology[J]. Cell Mol Life Sci, 2005, 62(4): 397-409.

[10] Ling L, Brody S L, Peng SL. Restraint of B cell activation by Foxj1-mediated antagonism of NF-kB and IL-6[J]. J Immunology, 2005, 175(2): 951-958.

[11] 刘祥德,何振平,梗阻性黄疸肾脏损伤机制实验研究[J].第三军医大学学报,2006,28(8):788-791.

(责任编辑:关蕴良)