

# 急性胆道感染对大鼠肝细胞凋亡相关蛋白表达的影响

李娜<sup>1</sup>, 伊秀梅<sup>2</sup>, 张磊<sup>1</sup> (1. 淄博市中心医院 消化内一科, 山东 淄博 255000; 2. 淄博市中心医院 门诊, 山东 淄博 255000)

**摘要:** 目的 研究急性胆道感染对大鼠肝细胞凋亡相关蛋白表达的影响。方法 选取实验大鼠35只, 适应喂养1周后将其随机分为5组, 每组7只。实验组大鼠均于胆总管注入大肠埃希菌0.2 ml, 诱导急性胆道感染模型, 分别于注入6小时、12小时、24小时和48小时后处死; 对照组大鼠胆总管注入生理盐水, 6小时后处死。留取各组大鼠肝组织, 采用Tunel染色法统计凋亡肝细胞计数, 采用免疫组织化学法计算肝脏Bcl-2与Bax阳性表达率。结果 对照组肝细胞病理无明显改变, 凋亡肝细胞少见; 各实验组均可见肝细胞坏死、变形, 并发生凋亡。对照组凋亡指数显著低于感染6小时、12小时、24小时和48小时组, 差异有统计学意义( $t$ 值分别为5.921、7.559、8.919、10.520,  $P$ 均 $< 0.001$ )。对照组和感染6小时组Bcl-2阳性表达率分别为85.71%和71.43%, 差异无统计学意义( $\chi^2 = 0.000$ ,  $P = 1.000$ ); 感染6小时和12小时组的Bcl-2阳性表达率显著高于感染12小时和24小时组( $P$ 均 $< 0.05$ )。对照组、感染6小时、12小时、24小时和48小时组的Bax阳性表达率分别为14.29%、28.57%、42.86%、100.00%和85.71%, 组间差异有统计学意义( $F = 9.314$ ,  $P < 0.001$ ), Bax阳性表达率随感染时间延长呈升高趋势, 于感染48小时有所下降。结论 急性胆道感染短时间即可诱导肝细胞凋亡, 并伴有凋亡相关蛋白Bcl-2阳性表达率的下降和Bax阳性表达率的升高。

**关键词:** 胆道感染, 急性; 肝细胞凋亡; 感染模型

## Influence of acute biliary tract infection on apoptosis-related protein expression of liver cells in rats

LI Na<sup>1</sup>, YIN Xiu-mei<sup>2</sup>, ZHANG Lei<sup>1</sup> (1. Department of Gastroenterology, Central Hospital of Zibo City, Zibo 255000, Shandong Province, China; 2. Department of Outpatient, Zibo 255000, Shandong Province, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the influence of acute biliary tract infection on apoptosis-related protein expression of liver cells in rats. **Methods** Total of 35 rats were selected and randomly divided into five groups after adaptive feeding for 1 week, 7 rats in each group. Rats in experimental groups were given injection of *Escherichia coli* into common bile duct to make acute biliary tract infection model and sacrificed after 6 h, 12 h, 24 h and 48 h of injection, respectively. Rats in control group were injected with normal saline into the common bile duct and sacrificed after 6 hours of injection. The number of apoptotic liver cells was counted by Tunel staining and positive expression rate of Bcl-2 and Bax in liver were detected by immunohistochemistry method. **Results** The liver cells in control group had no obvious pathological changes and the apoptotic hepatocytes were rare. The liver cells in all experimental groups were found necrotic and deformed and occurred apoptosis. The apoptosis index (AI) in control group were significantly lower than those at 6 h, 12 h, 24 h and 48 h after infection ( $t = 5.921, 7.559, 8.919, 10.520$ ;  $P < 0.001$ ). The positive expression rate of Bcl-2 in control group and 6 h infection group were 85.71% and 71.43%, respectively, the difference had no statistical significance ( $\chi^2 = 0.000$ ,  $P = 1.000$ ). The positive expression rate of Bcl-2 in 6 h and 12 h infection groups were significantly higher than those of 12 h and 24 h infection group ( $P < 0.05$ ). The positive expression rate of Bax in control group, 6 h, 12 h, 24 h and 48 h infection group were 14.29%, 28.57%, 42.86%, 100.00% and 85.71%, respectively, the difference was statistically significant ( $F = 9.314$ ,  $P < 0.001$ ). The positive expression rate of Bax increased with time going on, and decreased in 48 h after infection. **Conclusion** Acute biliary tract infection can induce the apoptosis of liver cells in a short time, which is accompanied by decreased expression of apoptosis related protein Bcl-2 and increased expression of Bax.

**Key words:** Biliary tract infection, acute; Hepatocyte apoptosis; Infection model

急性胆道感染属于临床常见胆道疾病,包括胆管炎和急性胆囊炎,该病多伴发胆道肿瘤和胆道结石等胆道疾病,相关数据显示全球范围内急性胆道感染发病率为1%~3%<sup>[1]</sup>。急性胆道感染后内毒素及细菌会对胆管黏膜造成影响,使其出现水肿、溃疡及充血等变化,进一步引发肝功能异常,出现急性化脓性感染甚至肝功能衰竭<sup>[2]</sup>。目前尚无急性胆道感染对肝组织凋亡相关蛋白表达影响的报道<sup>[3]</sup>,以往基于胆道感染动物模型所进行的实验研究仍存在一定不足,有待进一步完善<sup>[4,5]</sup>。本研究通过建立大鼠急性胆道感染模型,探讨急性胆道感染大鼠肝细胞凋亡相关蛋白的表达,现报道如下。

## 1 资料与方法

1.1 一般资料 本实验共选取35只雄性SD实验大鼠,体质量为(340±30)g,均选购于北京维通利华实验动物技术有限公司。

1.2 实验仪器及试剂 本研究以大肠埃希菌(中国生物制品鉴定中心)作为胆道感染的致病菌,菌液浓度为 $5 \times 10^9$ /ml;选用SP免疫组织化学染色试剂盒,由上海奇康生物科技有限公司提供;台式高速冷冻离心机购于艾本德中国有限公司;兔多克隆蛋白(rabbit polyclonal to bcl-2)(工作浓度:1:100)、兔多克隆BSX(rabbit polyclonal to bsx)(工作浓度:1:200)均购自于上海拜力生物科技有限公司。

## 1.3 实验方法

1.3.1 饲养及造模 本研究所选大鼠均经常规适应性饲养1周,自由进食、饮水,光照-黑暗12小时交替,大鼠随机分组,每组各7只,其中一组为对照组,其余均为实验组,分别实施手术操作并于手术完成后6小时、12小时、24小时和48小时接受检测或处理。急性胆道感染大鼠造模操作按照以下方法进行:将3%戊巴比妥注射至大鼠腹腔内行麻醉,用药剂量为30 mg/kg,选取大鼠上腹部正中位置行切口并进入腹腔。对照组大鼠胆总管内注入生理盐水,剂量为0.2 ml;实验组大鼠选择胆总管十二指肠上部约1 cm近端位置注入大肠埃希菌,浓度为 $5 \times 10^9$ /ml,剂量为0.2 ml,建立急性胆道感染动物模型,术后取大鼠胆道组织染色检查,均造模成功。所有大鼠术后仅可食用无菌糖盐水并采取单笼饲养,记录胆道注射试剂时间,并于饲养笼旁进行标记。

1.3.2 肝组织切片的制备 对照组大鼠注射生理盐水6小时后处死;实验组根据分组计划,依次于术后6小时、12小时、24小时和48小时处死,快速留取肝组织,于10%的甲醛液中固定6~12小时,取出后

进行石蜡包埋切片,行HE和Tunel染色。

1.3.3 HE染色 大鼠肝组织切片经HE染色后,光学显微镜下观察病理形态学,包括:肝组织结构、细胞完整程度及肝细胞脂肪坏死、出血、充血和变性等情况。

1.3.4 Tunel染色 大鼠肝组织切片经Tunel染色后统计凋亡指数,具体方法为:根据显微镜下阳性细胞的分布状态,选择3~4个不重叠阳性视野,放大20倍后对视野内阳性细胞数量进行统计,计算凋亡指数(apoptosis index, AI), $AI = \text{阳性细胞数} / \text{总细胞数}$ 。

1.3.5 免疫组织化学法检测Bcl-2及Bax的表达 本研究选取Bcl-2、Bax作为细胞凋亡标志蛋白,采用免疫组织化学技术检测各组大鼠肝细胞中Bcl-2及Bax表达。观察对比5组阳性Bcl-2及Bax表达细胞,以褐色判定为阳性,无明显着色判定为阴性。

1.4 统计学处理 本研究数据均采用SPSS 18.0统计软件进行处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间对比采用重复测量方差分析以及 $t$ 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 病理学特征 观察5组大鼠肝组织切片后发现,对照组大鼠肝细胞排列规整,细胞质呈红色,细胞核呈蓝色,病理变化不明显;实验组大鼠肝细胞均可见坏死、变形,且坏死灶随时间的延长其数量增加且面积扩大。感染6小时组可见炎细胞浸润,肝细胞存在小灶性变性且坏死,坏死灶内多伴有大量红细胞,并出现散在肝细胞嗜酸性变性;感染12小时组主要表现为胞浆深红染,细胞核呈固缩状,大鼠肝细胞嗜酸性变性,可偶见坏死灶内细菌;感染24小时组炎细胞浸润,肝细胞局灶性变性且坏死;感染48小时组脂滴沉淀于胞浆内,且肝细胞存在脂肪变性,见图1。

2.2 Tunel阳性细胞数的比较 各组间凋亡指数的差异有统计学意义( $F = 22.375, P < 0.001$ );对照组肝细胞凋亡指数显著低于感染6小时、12小时、24小时和48小时组,差异有统计学意义( $t$ 值分别为5.921、7.559、8.919、10.520,  $P$ 均 $< 0.001$ );随感染时间的延长,各组的Tunel阳性细胞数呈增大趋势,见表1。

2.3 各组Bcl-2和Bax的阳性表达率 对照组与感染6小时组Bcl-2阳性表达率差异无统计学意义( $\chi^2 = 0.000, P = 1.000$ );感染6小时组和感染12小时组Bcl-2阳性表达率均显著高于感染24小时和48小时组( $P$ 均 $< 0.05$ )。各组间Bax阳性表达率差异有统

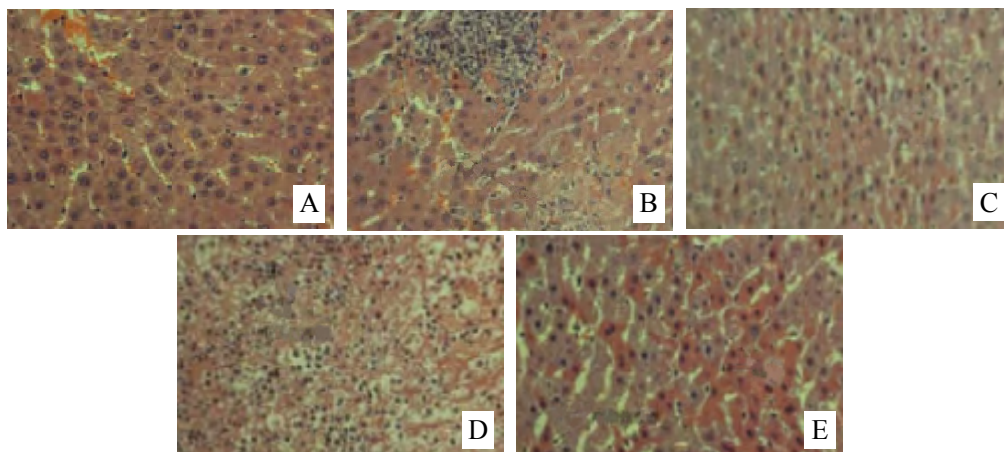


图1 肝组织病理切片（免疫组织化学染色，×400）

注：A 为对照组；B 为感染 6 小时组；C 为感染 12 小时组；D 为感染 24 小时组；E 为感染 48 小时组

表1 各组大鼠肝细胞凋亡指数、肝组织 Bcl-2 和 Bax 的阳性表达率

组别	凋亡指数 ( $\bar{x} \pm s$ )	Bcl-2阳性表达率 (%)	Bax阳性表达率 (%)
对照组 ( $n=7$ )	7.25 ± 1.26	85.71	14.29
感染6小时组 ( $n=7$ )	19.31 ± 5.24	71.43	28.57
感染12小时组 ( $n=7$ )	25.13 ± 6.13	57.14	42.86
感染24小时组 ( $n=7$ )	38.42 ± 9.16	14.29	100.00
感染48小时组 ( $n=7$ )	48.39 ± 10.27	0.00	85.71
F值	12.354	7.316	7.765
P值	< 0.001	< 0.001	< 0.001

注：与对照组相比，感染 6 小时、12 小时、24 小时和 48 小时组凋亡指数的  $t$  值分别为 5.921、7.559、8.919、10.520， $P$  均 < 0.001

计学意义 ( $F = 9.314$ ,  $P = 0.000$ )，实验组Bax阳性表达随着时间延长呈增多趋势，于感染48小时下降，见表1。

### 3 讨论

急性胆道感染可使致病菌快速产生内毒素并融入血液中，通过激活单核巨噬细胞及中性粒细胞产生大量自由基与细胞因子<sup>[6,7]</sup>。有研究显示，致病菌内毒素会造成肝脏等组织细胞出现凋亡<sup>[8]</sup>。细胞凋亡又称程序性细胞死亡（programmed cell death, PCD），是区别于细胞坏死的细胞主动性死亡，该过程涉及蛋白质表达、激活和调控等系列反应<sup>[9]</sup>。国外学者指出，由于凋亡细胞可能会被巨噬细胞和（或）正常细胞吞噬，类似肝细胞更新速度相对较快的组织在正常状态下很难进行凋亡细胞的观察<sup>[10,11]</sup>。急性胆道感染过程中肝细胞是否存在凋亡、由何种机制引起等均未明确论，临床多借助动物实验进行研究<sup>[12,13]</sup>。以往动物实验研究中细菌注入后以结扎动物远端胆总管的方法建立模型来研究急性胆道感染肝细胞是否产生细胞凋亡，该方法相对容易，但易导致胆总管梗阻，胆总管梗阻本

身即可造成肝细胞凋亡，对最终实验结果造成影响，效果不理想<sup>[14]</sup>。

本研究急性胆道感染动物模型的建立无需进行远端胆总管结扎，仅借助菌液浓度的增加来建立动物模型，以减少对最终实验结果造成的干扰。对照组凋亡指数显著低于各感染组，对照组与感染6小时组和感染12小时组Bcl-2阳性表达率差异显著，且感染24小时和48小时Bcl-2阳性表达率与感染6小时和12小时相比均下降。可说明急性胆道感染初期即出现肝细胞凋亡，且凋亡程度随感染时间的延长呈增加趋势，并贯穿急性胆道感染整个过程。此结果与相关研究结果大致相同<sup>[15,16]</sup>，因此可认为细胞凋亡可通过清除受损肝细胞来达到减少细胞成分泄露及炎症反应对细胞外空间结构造成的影响，可在一定程度上延缓肝细胞凋亡或坏死。国外学者研究<sup>[17,18]</sup>表明，细胞凋亡相关蛋白与Bcl-2家族存在关联，Bcl-2家族分为抑制凋亡蛋白及促凋亡蛋白两类，包括Bcl-2、Bax和Bak等，其中Bcl-2为抑制凋亡蛋白，Bax为促凋亡蛋白。Bcl-2和Bax为同源蛋白，均可单独形成二聚体或两者联合形成二聚体，

Bcl-2形成二聚体后抑制肝细胞凋亡的效果更好,而Bax形成的二聚体促凋亡作用更强<sup>[19,20]</sup>。本研究结果显示,与对照组相比,感染12小时及24小时组Bcl-2表达差异显著;感染12小时与感染24小时和48小时组相比,Bcl-2及Bax表达差异显著;各组间Bax表达差异显著,Bax的表达于感染12小时和24小时呈增多趋势,感染48小时后有所下降。由此可见,感染早期出现肝细胞凋亡可能与Bax表达的增多有关,感染24小时和48小时凋亡细胞数量增加可能与Bcl-2的减少有关。

综上所述,急性胆道感染后短时间内即可出现肝细胞凋亡,且贯穿于整个感染阶段,这可能与感染导致凋亡相关蛋白Bcl-2及Bax表达改变有关,值得进一步研究。本研究为临床急性胆道感染治疗提供了理论依据。

#### 参考文献

- [1] 赵水娣,王敏,林洁,等.急性胆道感染中肠球菌的耐药性检测及临床分析[J].中国现代医药杂志,2012,14(9):108-109.
- [2] 殷杰,刘俊,郑宇,等.老年急性胆道感染227例腹腔镜探查治疗体会[J].南通大学学报(医学版),2014,34(3):227-229.
- [3] 曾永毅,黄新辉.肝胆管结石合并胆道感染的诊断及处理[J].中国实用外科杂志,2016,36(3):295-299.
- [4] 周童.Cox-2、Bcl-2、Fas蛋白在胆道不全梗阻大鼠胆总管上皮细胞中的表达及意义[D].山东:泰山医学院,2014.
- [5] 季成春,刘金,陈海龙.清胆汤联合胆道减压内引流对急性重症胆管炎大鼠肝功能和炎症因子的影响[J].中医杂志,2013,54(6):512-515.
- [6] 王熙勋,姜立新,王景麟,等.急性胆道感染诱发肝细胞凋亡的实验研究[J].临床肝病杂志,2014,30(11):1164-1168.
- [7] 姚燕珍,鲍舟君,张晓帮,等.血清IL-6、IL-8和TNF- $\alpha$ 在胆道术后感染监测中的价值[J].医学研究杂志,2012,41(4):104-106.
- [8] 蔡轶伦,刘玉国,张磊,等.胆道感染患者病原菌分布与临床特征分析[J].中华医院感染学杂志,2016,26(8):1801-1803.
- [9] 赵彦超,顾耘.细胞凋亡通路研究进展[J].现代医学,2013,41(4):285-288.
- [10] Monteiro ME, Xavier AR, Oliveira FL, et al. Apoptosis induced by a low-carbohydrate and high-protein diet in rat livers[J]. World J Gastroenterol,2016,22(22):5165-5172.
- [11] Kelleni MT, Ibrahim SA, Abdelrahman AM. Effect of captopril and telmisartan on methotrexate-induced hepatotoxicity in rats: impact of oxidative stress,inflammation and apoptosis[J]. Toxicol Mech Methods,2016,26(5):371-377.
- [12] 钱秋海,钱卫斌,蔡欣蕊,等.糖肝康对硫代乙酰胺所致慢性肝损伤模型大鼠肝脏组织结构和Resistin表达的影响[J].中医学报,2016,31(2):238-242.
- [13] 于少飞,冯万禹,柴少卿,等.外源性白细胞介素-10对梗阻性黄疸大鼠Th17细胞相关因子表达及STAT3蛋白活化的影响[J].解剖科学进展,2015,21(6):645-647,651.
- [14] 元海成,秦鸣放,邹富胜,等.大鼠胆总管结扎后不同时间点的生化指标变化[J].中国中西医结合外科杂志,2011,17(6):583-585.
- [15] 马睿.血浆降钙素原(PCT)预测胆道梗阻大鼠早期隐匿性胆道感染的实验研究[D].大理:大理大学,2015.
- [16] 袁海燕,胡亚哲.不同强度有氧运动对大鼠肝细胞的影响[J].中国组织工程研究,2015,19(51):8311-8316.
- [17] Shukla S, Sharma A, Pandey VK, et al. Concurrent acetylation of FoxO1/3a and p53 due to sirtuins inhibition elicit Bim/PUMA mediated mitochondrial dysfunction and apoptosis in berberine-treated HepG2 cells[J]. Toxicol Appl Pharmacol,2016,291:70-83.
- [18] Marin JJ, Hernandez A, Revuelta IE. Mitochondrial genome depletion in human liver cells abolishes bile acid-induced apoptosis: role of the Akt/mTOR survival pathway and Bcl-2 family proteins[J]. Free Radic Biol Med,2013,61:218-228.
- [19] 传良敏,黄文芳,杨永长,等.p53、Bcl-2、Bax在甘氨酸氧胆酸盐诱导人正常肝细胞HL-7702细胞凋亡机制中的作用[J].四川医学,2013,34(2):165-167.
- [20] 李文成,王刚,陈解元,等.依达拉奉对气腹大鼠肝内胆管上皮细胞凋亡、Bcl-2表达的影响[J].实用医学杂志,2013,29(7):1058-1060.

收稿日期:2016-06-27

李娜,伊秀梅,张磊.急性胆道感染对大鼠肝细胞凋亡相关蛋白表达的影响[J/CD].中国肝脏病杂志(电子版),2017,9(1):87-90.