

- 硬化杂志, 2006, 14(11): 1007-1009.
- [7] Kim Jk, Gavrilova O, Chen Y, et al. Mechanism of insulin resistance in A-ZIP/F-1 fatless mice[J]. J Biol Chem, 2000, 275: 8456-8460.
- [8] Moit ra J, M ason MM, O live M, et al. Life without white fat: A transgenic mouce[J]. G enes Dev, 1998, 12(20): 3168-3181.
- [9] Shimomura I, Hammer RE, Richardson JA, et al. Insulin resistance and diabetes mellitus in transgenic mice expressing nuclear SREBP-1c in adipose tissue: model for congenital generalized lipodystrophy [J]. Genes Dev., 1998(12): 3182-3194.
- [10] Rong X, Li Y, Ebihara K, et al. An adipose tissue-independent insulin-sensitizing action of telmisartan: a study in lipodystrophic mice [J]. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2009, 331: 1096-1103.
- [11] Shimano H. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid regulators of synthetic genes[J]. Prog Lipid Res, 2001, 40(6): 439-452.
- [12] Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in liver[J]. J Clin Invest, 2002, 109(9): 1125-1131.
- [13] Shimomura I, Bashmakov Y, Horton JD, et al. Increased levels of nuclear SREBP-1c associated with fatty liver in two mouse models of diabetes mellitus[J]. Genes Dev., 1999, 274 (2): 30028-30032.
- [14] Deslypere JP, Verdonck L, Vermeulen A. Fat tissue: a steroid reservoir and site of steroid metabolism[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1985, 61(3): 564-570.
- [15] Strickland LR, Lok K, Guo FJ, et al. Type 2 diabetes with partial lipodystrophy of the limbs [J]. Diabetes Care, 2013, 36: 2247-2253.
- [16] Rother KL, Brown RD. Novel forms of lipodystrophy, why should we care[J]? Diabetes Care, 2013, 36: 2142-2145.
- (编辑: 邓响潮)

乙醇诱导人胃上皮细胞株凋亡的研究

刘翠玲¹, 黄可儿², 陈柏书¹, 来慧丽¹ (1. 广州中医药大学, 广东 广州 510405; 2. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405)

摘要: **目的** 探讨建立乙醇诱导人胃上皮细胞株 (GES-1) 凋亡模型的方法和可行性。**方法** 采用罗氏细胞实时动态分析仪、MTT 比色法、Hoechst 染色法、Annexin V-FITC/PI 凋亡流式检测研究不同浓度的乙醇对人胃上皮细胞株(GES-1)凋亡作用。**结果** (1)当乙醇浓度大于 0.5 mol·L⁻¹ 时, 对 GES-1 细胞株有明显的诱导凋亡作用, 而考察的 TNF-α(100, 50 ng·mL⁻¹)则没有明显的细胞凋亡诱导作用;(2)通过形态学观察, 发现乙醇模型组 GES-1 细胞株出现明显的凋亡细胞形态学改变;(3)Annexin V-FITC/PI 凋亡流式分析结果发现乙醇浓度大于 0.2 mol·L⁻¹ 对细胞具有明显的诱导凋亡作用, 乙醇主要诱导 GES-1 细胞株进入早期凋亡, 且具有浓度依赖性, 但该诱导作用具有时效性, 在作用持续 60 min 后, 其诱导作用会逐渐减弱。**结论** 乙醇对 GES-1 细胞株具有明显的诱导细胞凋亡作用, 且具有浓度依赖性及时效性; 本凋亡模型具有较好的重现性。

关键词: 人胃上皮细胞; 乙醇; 凋亡

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)01-0101-06

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.01.027

Establishment of Human Gastric Epithelial Cells Apoptosis Model Induced by Ethanol

LIU Cuiling¹, HUANG Ke'er², CHEN Baishu¹, LAI Huili¹ (1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China; 2. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China)

收稿日期: 2013-08-22

作者简介: 刘翠玲, 女, 博士研究生, 研究方向: 调理脾胃方药的临床与实验研究。Email: liuculing0912@163.com。通讯作者: 黄可儿, 研究员, 博士生导师, 主要从事中医药防治脾胃疾病的研究。Email: hke8989@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81072946)。

Abstract: Objective To explore the feasibility of establishing the model of human gastric epithelial cells(GES-1) apoptosis model induced by ethanol. **Methods** Cell viability and apoptosis induced by ethanol were assessed by MTT assay, cell real-time dynamic analyzer, Hoechst staining, and Annexin V-FITC/PI. **Results** (1)When the concentration of ethanol in cell culture medium was higher than $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, GES-1 showed obvious injury and apoptosis. $\text{TNF-}\alpha$ ($100, 50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) showed no obvious apoptosis induction for the GES-1. (2)The morphological examination showed that the GES-1 of ethanol group appeared apoptotic morphological changes. (3)The results of Annexin V-FITC/PI combined with flow cytometry analysis showed that ethanol at the concentration higher than $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ induced the apoptosis of GES-1, and the apoptotic cells were almost in early-stage apoptosis, the effect being concentration-dependent. But after 60 minutes, the effect would gradually weaken. **Conclusion** The results demonstrated that ethanol can induce the apoptosis of GES-1 in time- and dose-dependent. The established apoptosis model has good reproducibility.

Keywords: Human gastric epithelial cells; Ethanol; Apoptosis

胃黏膜损伤性疾病是临床上的多发性、难治、常见疾病,包括胃溃疡、胃炎、胃黏膜应激性损伤等。而乙醇(酒精)在日常生活中的滥用,则是该疾病高发率的重要诱因之一。有研究^[1-5]报道乙醇在对机体造成损伤时,可通过诱导机体合成、分泌活性氧簇(reactive oxygen species, ROS) O_2^- 、 H_2O_2 及 HO_2^- 、 OH^- 等,ROS通过细胞氧化应激反应,攻击细胞的基本成分如蛋白、脂质、核酸等,一方面诱导磷脂膜中脂肪酸的过氧化反应,从而导致了脂质过氧化物、氧自由基及脂质分解物等有毒物质的产生;另一方面高浓度的ROS具有细胞毒作用,可引起细胞凋亡、坏死。中药治疗胃黏膜损伤性疾病及调理脾胃方面有着独特效果,但是其分子机制尚未明确。建立有效的动物及细胞病理模型均可为调理脾胃中药的研究提供重要的支撑。本研究通过建立乙醇诱导GES-1细胞株凋亡模型,为进一步研究乙醇对胃黏膜的损伤机制及中药及复方在调理脾胃方面的药理机制研究做铺垫。

1 材料与方法

1.1 细胞株 人胃上皮细胞株GES-1,购自北京肿瘤防治研究所遗传室。

1.2 试剂 DMEM培养基,货号:C1995,美国Gibco公司;胰酶,美国GIBCO公司;胎牛血清,浙江天杭生物科技有限公司;甲基四唑蓝(MTT),美国Sigma公司;乙醇,食用级,广州东征仪器试剂公司;二甲基亚砷(DMSO),美国Sigma公司;肿瘤坏死因子- α (TNF- α),美国Sigma公司;磷酸盐缓冲

溶液(PBS),武汉博士德生物科技有限公司;Annexin V-FITC/PI凋亡试剂盒,上海贝博有限公司。

1.3 仪器 实时细胞动态分析仪,瑞士Roche公司;洁净操作工作台,苏州安泰空气技术有限公司;细胞培养箱,美国Thermo公司;荧光倒置显微镜,日本Olympus公司;光学显微镜,德国Leica公司;酶标仪,TECAN公司;cytomics FC500 MCL流式细胞仪,美国贝克曼-库尔特公司。

1.4 方法

1.4.1 溶液的配制 (1)细胞培养基:含10%胎牛血清的DMEM培养基。(2)MTT溶液:称取100 mg MTT粉末溶于PBS($0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH7.4)溶液配成 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶液,用 $0.22 \mu\text{m}$ 的微孔滤器过滤除菌即得。(3)hoechst33324溶液:称取5 mg MTT粉末溶于超纯水,配成 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶液,保存于 -20°C ,使用时按照1:1000稀释成 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶液。

1.4.2 细胞的传代及培养 用含10%胎牛血清的DMEM培养基于 37°C 、5% CO_2 培养箱内培养,显微镜下观察细胞95%融合时即可传代。经PBS洗涤,胰酶消化细胞,用含10%胎牛血清的培养液终止消化,经适量细胞培养液重悬后,分装成若干瓶继续培养。

1.4.3 乙醇诱导GES-1细胞株损伤模型的建立及细胞株存活率检测

1.4.3.1 实时细胞动态分析仪分析GES-1细胞株的生长活力 取处于对数生长期的GES-1细胞株,消化、

重悬，并接种于 E-plate16 孔板，每孔 12000 个，再将 E-plate16 孔板置于细胞实时动态分析仪，于 37℃、5 % CO₂ 培养箱内培养，待细胞贴壁 12~14 h，然后分组进行实验。分为正常对照组、乙醇组、TNF-α 组，每组 4 孔。乙醇组给予含不同浓度乙醇的培养基，TNF-α 组给予含不同浓度 TNF-α 的培养基，正常对照组则给予含 10%胎牛血清的新鲜细胞培养基。采用 Xicellgenge 软件每 15 min 检测和分析细胞指数(CI)。

1.4.3.2 MTT 法检测 GES-1 细胞株的生长活力 取处于对数生长期的 GES-1 细胞株，消化、重悬，并接种于 96 孔培养板，每孔 3500 个，于 37℃、5 % CO₂ 培养箱内培养，待细胞贴壁 12~14 h，然后分组进行实验。分为正常对照组、乙醇组、TNF-α 组，每组 6 孔。乙醇组给予含不同浓度乙醇的培养基，TNF-α 组给予含不同浓度 TNF-α 的培养基，正常对照组则给予含 10 %胎牛血清的新鲜细胞培养基。培养 24 h 后，加入 MTT(5 mg·mL⁻¹)20 μL，37℃培养 4 h 后吸去上清液，每孔加入 DMSO 100 μL，摇床摇匀 15 min，使结晶物完全溶解。酶标仪检测各孔光密度(OD)值(波长 570 nm)。

1.4.3.3 乙醇对 GES-1 细胞株损伤的形态学改变 (1)取处于对数生长期的 GES-1 细胞株，消化、重悬，并接种于 6 孔培养板，每孔 20000 个，于 37℃、5 % CO₂ 培养箱内培养，待细胞贴壁 12~14 h，然后分组进行实验。分为正常对照组、乙醇组、TNF-α 组，每组 6 孔，乙醇组给予含不同浓度乙醇的培养基，TNF-α 组给予含不同浓度 TNF-α 的培养基，正常对照组则给予含 10 %胎牛血清的新鲜细胞培养基。分别在 0，1，2，4，6，8，10，12，24 h 光学显微镜下观察细胞形态。(2)荧光显微镜下观察乙醇对 GES-1 细胞株损伤的形态学改变 (Hoechst 染色法)：取处于对数生长期的 GES-1 细胞株，消化、重悬，并接种于 24 孔培养板，每孔 30000 个，于 37℃、5 % CO₂ 培养箱内培养，待细胞贴壁 12~14 h，然后即可分组进行实验。分为正常对照组、乙醇组，每组 3 孔，乙醇组给予含不同浓度乙醇的培养基，正常对照组则给予含 10 %胎牛血清的新鲜细胞培养基。观察时间分别为 15，30，60，120，240 min。待到达观察时间后，加入 4 %多聚甲醛固定及 Hoechst 进行染色，荧光倒置显微镜下每孔任选 5

个视野观察，计数凋亡细胞和总细胞数，并计算凋亡率。

1.4.3.4 Annexin V-FITC/PI 对乙醇对 GES-1 细胞株的凋亡检测分析 取处于对数生长期的 GES-1 细胞株，消化、重悬，并接种于 6 孔培养板，每孔 200000 个，于 37℃、5 % CO₂ 培养箱内培养，待细胞贴壁 12~14 h，然后分组进行实验。分为溶剂空白组、正常对照组、乙醇组，乙醇组给予含不同浓度乙醇的培养基，正常对照组则给予含 10 %胎牛血清的新鲜细胞培养基。观察时间分别为 15，30，60，120，240 min。待到达观察时间后，按照 Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒说明进行操作，流式细胞仪检测。

1.5 统计学分析 数据用 SPSS13.0 统计软件进行分析，以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示；数据资料满足正态性与方差齐性，采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)，组间比较采用 LSD 法；若不满足方差分析的条件，采用秩和检验(Kruskal-Wallis 检验)。P < 0.05 为差异有统计学意义。以上实验均重复 3 次。

2 结果

2.1 乙醇对 GES-1 细胞株的生长活力影响 见图 1~图 2，表 1。分别考察了乙醇的 6 个浓度组，分别为 0.2，0.4，0.5，0.6，0.8，1 mol·L⁻¹，及 TNF-α 100，50 ng·mL⁻¹ 两个浓度组。与正常对照组(CELL)比较，乙醇 4 个浓度组(0.5，0.6，0.8，1 mol·L⁻¹)的生长活力下降，差异有统计学意义(P < 0.05)，表明对 GES-1 细胞株的生长有显著损伤或抑制作用，其余浓度组均无明显差异。实时细胞动态分析结果与 MTT 结果基本一致。

表 1 乙醇对 GES-1 细胞株的生长活力影响($\bar{x} \pm s$)

组别	浓度 / mol·L ⁻¹	细胞活力(OD)
正常对照组	—	1.0430 ± 0.00268
乙醇组	0.2	0.9773 ± 0.03855
乙醇组	0.4	1.0253 ± 0.00843
乙醇组	0.5	0.617 ± 0.11734*
乙醇组	0.6	0.4278 ± 0.07994*
乙醇组	0.8	0.4523 ± 0.02181*
乙醇组	1.0	0.4138 ± 0.00592*
TNF-α 组	50 ng·mL ⁻¹	1.0035 ± 0.01602
TNF-α 组	100 ng·mL ⁻¹	1.0113 ± 0.01348

注：与正常对照组比较，*P < 0.05。

2.2 光学显微镜下观察乙醇对 GES-1 细胞株损伤的

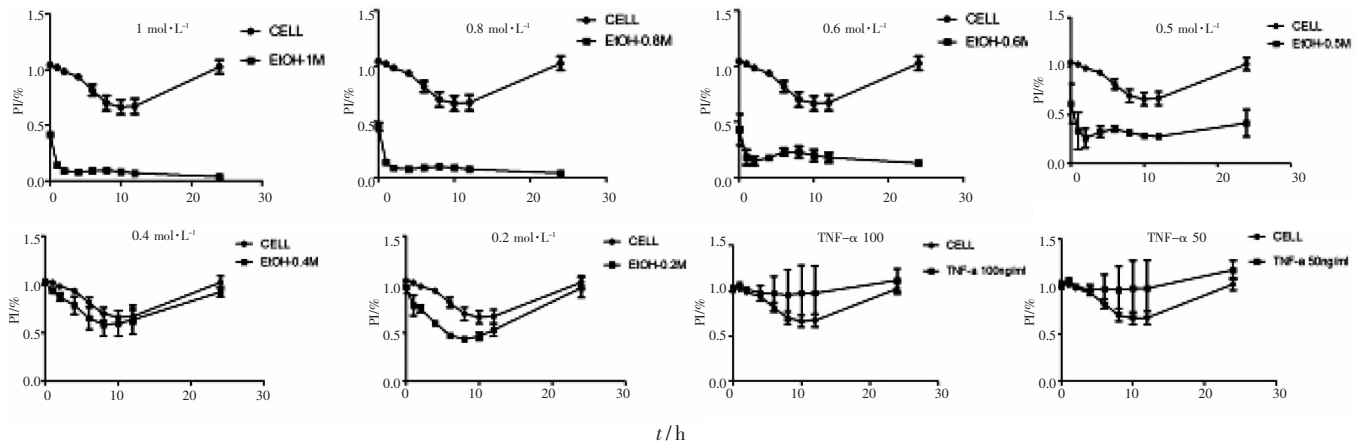
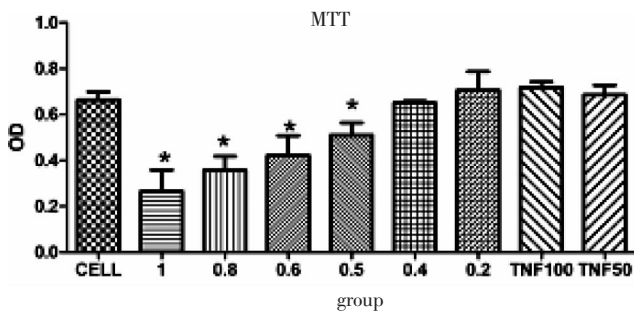


图1 乙醇对 GES-1 细胞株的生长活力影响(RTCA)

Figure 1 Effect of ethanol on the vitality of GES-1(RTCA)



注: 与 cell 对照组比较, * $P < 0.05$ 。

图2 乙醇对 GES-1 细胞株的生长活力影响(MTT)

Figure 2 Effect of ethanol on the vitality of GES-1(MTT)

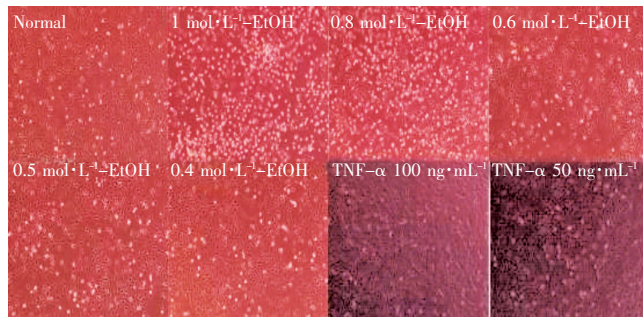


图3 乙醇对 GES-1 细胞株形态变化(1 h)

Figure 3 Effect of ethanol on the morphology of GES-1(1 h)

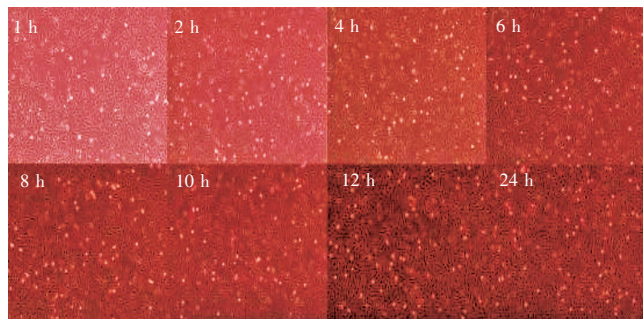


图4 乙醇对 GES-1 细胞株形态变化(CELL)

Figure 4 Effect of ethanol on the morphology of GES-1(CELL)



图5 乙醇对 GES-1 细胞株形态的影响(EtOH-0.8 mol·L⁻¹)

Figure 5 Effect of ethanol on the morphology of GES-1(EtOH-0.8 mol·L⁻¹)

形态学改变 见图3~图5。正常细胞贴壁正常,培养基漂浮的死亡细胞少,与正常对照组比较,乙醇高浓度模型组(1.0, 0.8 mol·L⁻¹)出现明显的细胞皱缩变小、成圆形,培养基漂浮的细胞增多。

2.3 Hoechst 染色法观察乙醇对 GES-1 细胞株损伤的形态学改变 结果见图6~8。细胞的凋亡在形态学上的表现为细胞收缩、染色质凝聚及核的碎裂。Hoechst33324 可穿过细胞膜,能对将活细胞的细胞核进行染色,在紫外光激发后发出蓝色荧光,从而用于活细胞的标记,凋亡细胞由于染色质固缩,细胞核呈致密浓染,或呈碎块致密浓染,在荧光显微镜下观察可看到明亮的浓缩点,这些点被称为凋亡小体。乙醇组细胞出现明显的皱缩、染色质固缩及碎块致密浓染等。通过计算各剂量组的凋亡细胞率,与正常对照组

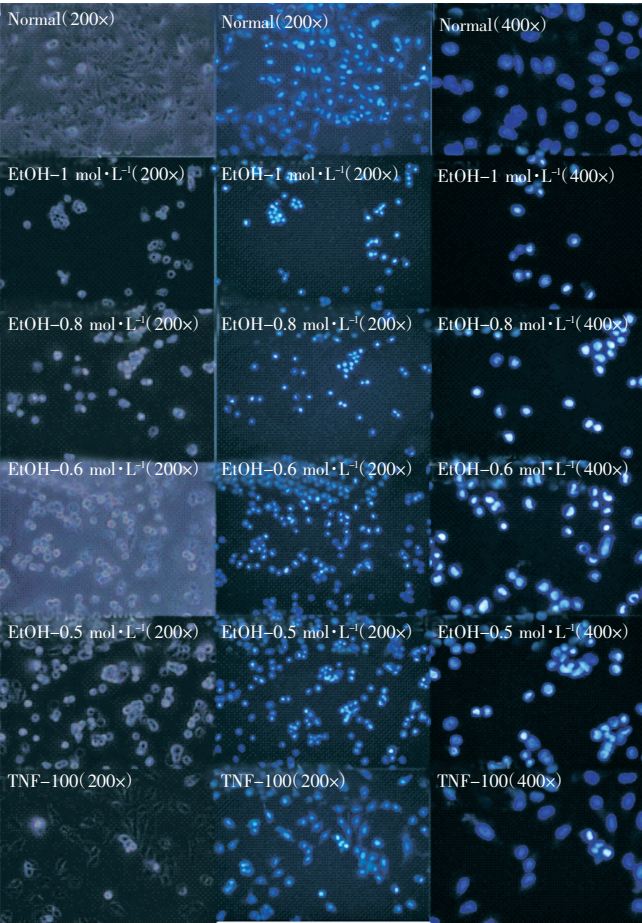
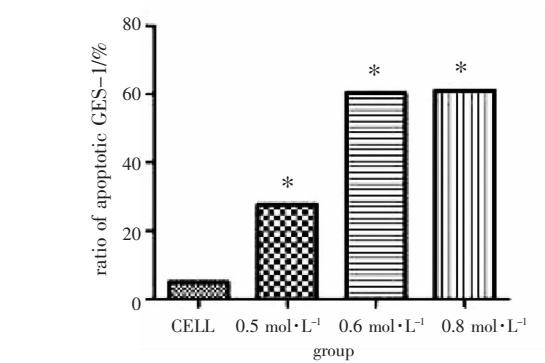


图 6 乙醇对 GES-1 细胞株形态的影响(Hoechst 染色法)
Figure 6 Effect of ethanol on the morphology of GES-1(Hoechst)



与 CELL 组比较, * $P < 0.05$
图 8 乙醇对 GES-1 细胞株凋亡的影响(Hoechst 染色法)
Figure 8 Effect of ethanol on the apoptosis of GES-1(Hoechst staining)

相比,乙醇的 3 个剂量组均有明显的诱导 GES-1 细胞株凋亡的作用。

2.4 乙醇处理后 GES-1 细胞株流式凋亡检测 见图 9~图 10。比较 2 h 时间段内,乙醇不同浓度组与正常对照组比较,且随着浓度提高,早期凋亡率(即 A4 区)增加,差异均有统计学意义($P < 0.05$),说明

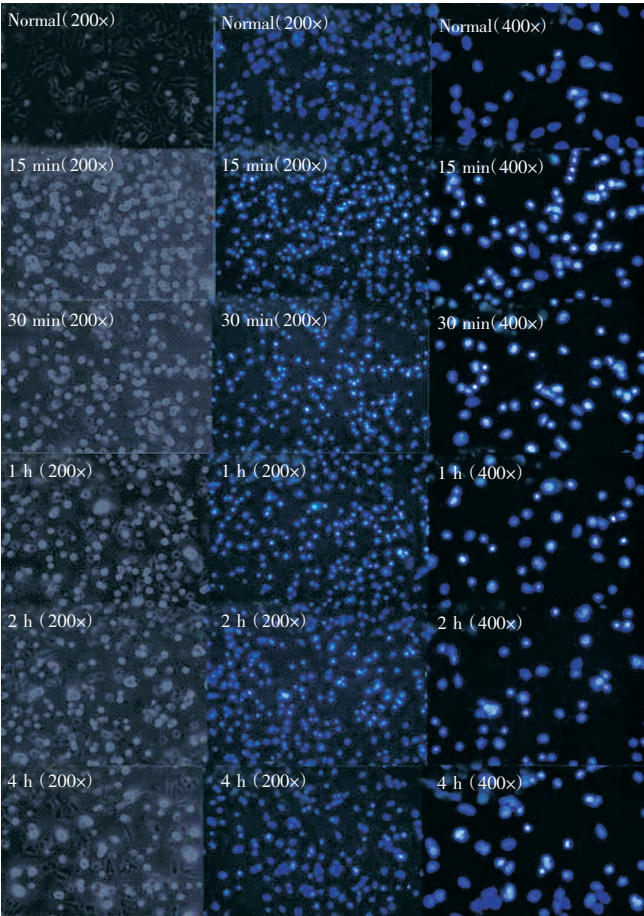
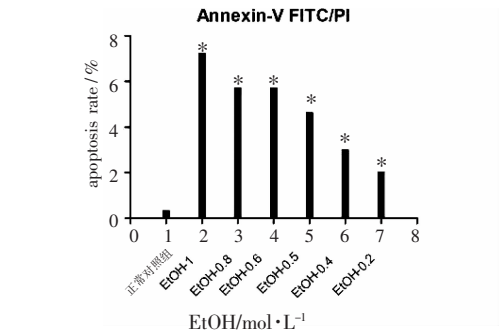


图 7 乙醇对 GES-1 细胞株形态的影响(EtOH-0.5 mol·L⁻¹)
Figure 7 Effect of ethanol on the morphology of GES-1(EtOH-0.5 mol·L⁻¹)



注:与正常对照组比较, * $P < 0.05$ 。
图 9 乙醇对 GES-1 细胞株凋亡的影响(Annexin-V FITC/PI)
Figure 9 Effect of ethanol on the apoptosis of GES-1(Annexin-V FITC/PI)

乙醇对 GES-1 细胞株的凋亡作用有浓度依赖性。我们也比较乙醇(0.5 mol·L⁻¹)在 15, 30, 60, 120, 240 min 5 个不同时间段对 GES-1 细胞株的凋亡作用,发现乙醇可在短时间内对 GES-1 细胞造成损伤,但随着作用时间的延长,其抑制作用则有所下降。

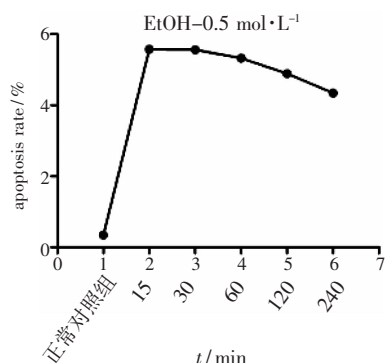


图 10 乙醇对 GES-1 细胞株凋亡的影响 (Annexin-V FITC/PI)
Figure 10 Effect of ethanol on the apoptosis of GES-1 (Annexin-V FITC/PI)

3 讨论

本实验采用不同的分析方法, 从不同层面研究乙醇对 GES-1 细胞株的损伤情况, 以 MTT 法及实时细胞动态分析仪检测乙醇对 GES-1 细胞株的活力的影响, 光学显微镜及荧光显微镜结合 Hoechst33324 观察乙醇对 GES-1 细胞株形态学的改变, Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒结合流式分析乙醇对 GES-1 细胞株凋亡率及凋亡周期的影响。由于方法的灵敏度差异, MTT 法及实时细胞动态分析仪, 与流式分析乙醇对 GES-1 细胞损伤的浓度有所差异。

本研究显示, 乙醇可在短时间内 (15 min) 对 GES-1 细胞的诱导凋亡, 且多为早期凋亡, 但是随着作用时间的延长, 对细胞株造成明显的细胞凋亡作用, 随着浓度的加大, 凋亡作用越为明显, 持续作用 1 h 后, 乙醇对细胞的诱导凋亡作用开始有所减弱, 这可能与乙醇的挥发性及细胞的自我修复能力有关, 因此在采用乙醇诱导细胞凋亡过程中需及时补充刺激剂 (即乙醇), 以确保促凋亡作用的持续性。

有报道^[6]在研究 MicroRNAs 对乙醇诱导胃上皮细胞凋亡中的作用发现, 以 0.8, 1 mol·L⁻¹ 乙醇的 EtOH 孵育 4 h 的细胞模型最为稳定, 且具有明显的氧化应激和炎症反应, 细胞凋亡率显著上升和 caspase-3 活性上调。本实验采用 Hoechst 染色法观

察乙醇对细胞形态的影响, 发现细胞大量出现皱缩、染色质固缩及碎块致密浓染等, 并形成明显的凋亡小体。

有文献报道^[7]TNF- α 在诱导人胃上皮肠化时, 发现 TNF- α 只有在低于 1 ng·mL⁻¹ 时对 GES-1 细胞没有明显的细胞损伤和抑制作用。本研究在探讨建立乙醇对 GES-1 细胞株的凋亡模型中, 还比较了乙醇及常用的凋亡诱导剂 TNF- α (100, 50 ng·mL⁻¹) 对 GES-1 细胞株的凋亡作用, 发现乙醇对细胞的诱导作用效果明显优于 TNF- α , 可在短时间内起到明显诱导凋亡作用, 且价格也明显低于 TNF- α 。

但乙醇作为细胞凋亡诱导剂存在着一定局限性, 乙醇的挥发性容易造成刺激作用的时效较短, 同时确保每次加入乙醇浓度的一致性也是试验结果重现的重要关键。

参考文献:

- [1] Tyessen S, Singer MV. Alcohol related diseases of the oesophagus and stomach[J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2003, 17(4): 557-573.
- [2] Lazartors S, Kashimuar H, Nakahar K, et al. Gastric ulcer induced by Submucosal injection of ET-Irole of potent vasoconstrictor and inrtaluminal acid[J]. Am J Physsiol, 1993, 265: 492.
- [3] Slomiany A, Piotrowski, Piotrowski J, et al. Impact of ethanol on innate protection of gastric mucosal epithelial surfaces and the risk of injury[J]. Physiol Pharmacol, 2000, 51(3): 433-447.
- [4] Shindo Y, Konagaya M, Harasawa S, et al. The role of histamine in ethanol-induced gastric mucosal injury in the rat[J]. Tokai J Exp Clin Med, 1997, 22(2): 59-64.
- [5] Melchiorri D, Sewerynek E, Reiter RJ, et al. Suppressive effect of melatonin administration on ethanol-induced gastroduodenal injury in rats in vivo[J]. Br J Pharmacol, 1997, 121(2): 264-270.
- [6] 罗秀菊. MicroRNAs 在乙醇诱导的大鼠胃黏膜损伤中的作用及壬酸香草醇酯的干预研究[D]. 长沙: 中南大学, 2006: 61-75.
- [7] 赵敏. 胃复春对 TNF- α 诱导人胃上皮 GES-1 细胞肠化的影响[J]. 内蒙古中医药, 2012, (3): 39-41.

(编辑: 邓响潮)