

# 尿液环境中肠上皮细胞及其凋亡因子半胱氨酸蛋白酶 3、Bax 和 Bcl-2 表达的变化

<https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-4344.3213>

徐彬, 杨秀书, 刘旋, 王振兴

2095-4344.3213

投稿日期: 2020-05-11

送审日期: 2020-05-16

采用日期: 2020-07-09

在线日期: 2020-12-04

中图分类号:

R459.9; R318; R329.2

文章编号:

2095-4344(2021)20-03173-05

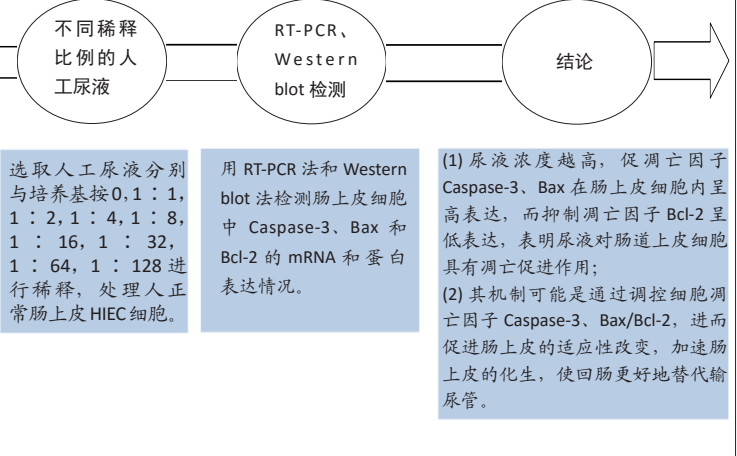
文献标识码: B

## 文章快速阅读:

### 文章亮点一

△应用回肠代输尿管重建尿路的连续性在临床上取得了较好的疗效,然而,回肠的适应性改变与什么有关目前尚未见报道。是否尿液环境影响回肠适应性改变?尿液环境如何影响回肠代输尿管重建尿路?

△为进一步研究回肠代输尿管应用的适应过程中是否有其他影响因素和细胞通路,以及回肠替代输尿管后的病理学特点提供实验依据。



## 文题释义:

**尿液环境:** 是连接肾与膀胱通道中的细胞在一种主要成分为水、尿素、尿酸、无机盐的液体生存空间中, 直接或间接影响细胞生存的各种因素。此次研究选择 pH 5.5、高浓度渗透压为 2 000 mOsm/(kg·H<sub>2</sub>O) 的人工尿液和一定比例的培养基稀释构成细胞液体生存空间的影响因素。

**肠上皮细胞:** 是具有极性的柱状上皮细胞, 参与小肠黏膜上皮组织的构成, 由隐窝下 1/3 处的干细胞生成, 在 3-5 d 内到达肠腔, 其子代细胞沿隐窝绒毛细胞轴迁移、逐渐成熟衰老最终在绒毛顶端脱落。肠道黏膜上皮细胞稳态是由上皮细胞不断增殖与凋亡之间的平衡来维系, 一般情况下凋亡处于低水平。

## 摘要

**背景:** 回肠代输尿管重建尿路, 在临床上取得了较好的疗效。回肠代输尿管后的适应性改变与什么有关目前尚未见有关报道。此次研究希望通过观察尿液对肠上皮细胞内凋亡因子表达的影响, 进一步探讨背后可能的机制, 为回肠代输尿管后的病理学特点提供实验依据。

**目的:** 观察尿液环境对肠上皮细胞内凋亡因子半胱氨酸蛋白酶 3(Caspase-3)、Bax、Bcl-2 表达的影响, 进一步探讨尿液环境是否促进了肠上皮细胞的凋亡及其机制。

**方法:** 选取人工尿液分别与培养基按 0, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 进行稀释, 处理人正常肠上皮细胞, 分别处理 24, 48, 72 h, 用 CCK-8 法检测, 观察尿液对肠上皮细胞增殖的影响。采用 RT-PCR 法和 Western blot 法检测肠上皮细胞中 Caspase-3、Bax 和 Bcl-2 的 mRNA 和蛋白表达情况。

**结果与结论:** ①肠上皮细胞内凋亡因子 Caspase-3、Bax 在尿液浓度最高的组中呈高表达, 随着尿液浓度梯度的不断降低, 表达水平逐渐降低; ②肠上皮细胞内抗凋亡因子 Bcl-2 在尿液浓度高的组中(1:8 和 1:16 组)呈低表达, 随着尿液浓度梯度的不断降低, 表达水平逐渐升高; ③提示尿液浓度越高, 促凋亡因子 Caspase-3、Bax 在肠上皮细胞内呈高表达, 而抑制凋亡因子 Bcl-2 呈低表达, 表明尿液对肠道上皮细胞具有凋亡促进作用。

**关键词:** 尿液; 肠上皮细胞; 凋亡; 回肠; 输尿管; Caspase-3; Bax; Bcl-2

## Changes of intestinal epithelial cells and their apoptotic factors Caspase-3, Bax and Bcl-2 under urinary environment

Xu Bin, Yang Xiushu, Liu Xuan, Wang Zhenxing

Department of Urology, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002, Guizhou Province, China

Xu Bin, Master, Attending physician, Department of Urology, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002, Guizhou Province, China

**Corresponding author:** Wang Zhenxing, Master, Attending physician, Department of Urology, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002, Guizhou Province, China

贵州省人民医院泌尿外科, 贵州省贵阳市 550002

第一作者: 徐彬, 男, 1981 年生, 贵州省贵阳市人, 2015 年贵州医科大学毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事泌尿系肿瘤及上尿路修复重建方面的研究。

通讯作者: 王振兴, 硕士, 主治医师, 贵州省人民医院泌尿外科, 贵州省贵阳市 550002

<https://orcid.org/0000-0002-4345-8869> (徐彬)

基金资助: 贵州省科学技术厅资助项目(黔科合基础[2018]1100), 项目负责人: 王振兴

引用本文: 徐彬, 杨秀书, 刘旋, 王振兴. 尿液环境中肠上皮细胞及其凋亡因子半胱氨酸蛋白酶 3、Bax 和 Bcl-2 表达的变化 [J].

中国组织工程研究, 2021, 25(20):3173-3177.



## Abstract

**BACKGROUND:** Reconstruction of the urinary tract with the ileum instead of the ureter has achieved a good clinical effect. There are yet no reports on what the adaptation relates to after the ileum acts as a substitute of the ureter. This study attempted to observe the effect of urine on the expression of apoptotic factors in intestinal epithelial cells, to further explore the possible underlying mechanism, and to provide experimental evidence for the pathological characteristics of the ileum instead of the ureter.

**OBJECTIVE:** To observe the effect of urine environment on the expression of Caspase-3, Bax and Bcl-2 in human intestinal epithelial cells and to further investigate whether the urine environment promotes the apoptosis of intestinal epithelial cells and its underlying mechanism.

**METHODS:** Human normal intestinal epithelial cells were treated with artificial urine that was diluted in culture medium at the rate of 0, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, and 1:128 for 24, 48, and 72 hours. Cell counting kit-8 was used to observe the effect of urine on the proliferation of intestinal epithelial cells. RT-PCR and western blot assay were used to detect the mRNA and protein expressions of Caspase-3, Bax and Bcl-2 in intestinal epithelial cells.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Caspase-3 and Bax were highly expressed in intestinal epithelial cells of the group with the highest urine concentration, and the expression level gradually decreased as the urine concentration gradient decreased. The expression of Bcl-2 in intestinal epithelial cells was low in the group with the highest urine concentration, and the expression level gradually increased as the urine concentration gradient decreased. The higher the urine concentration, the higher the expression of pro-apoptotic factors Caspase-3 and Bax in intestinal epithelial cells, and the lower the expression of anti-apoptotic factor Bcl-2, indicating that the urine can promote the apoptosis of intestinal epithelial cells.

**Key words:** urine; intestinal epithelial cells; apoptosis; ileum; ureter; Caspase-3; Bax; Bcl-2

**Funding:** the grant from the Department of Science and Technology of Guizhou Province, No. [2018]1100 (to WZX)

**How to cite this article:** XU B, YANG XS, LIU X, WANG ZX. Changes of intestinal epithelial cells and their apoptotic factors Caspase-3, Bax and Bcl-2 under urinary environment. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2021;25(20):3173-3177.

## 0 引言 Introduction

小肠黏膜上皮组织是由肠上皮细胞构成，上皮细胞向上延伸形成指状突起的绒毛，而下陷形成隐窝。肠上皮细胞由柱状上皮细胞构成，隐窝下 1/3 处的干细胞生成后，在 3-5 d 内到达肠腔，肠上皮细胞的子代细胞沿隐窝绒毛细胞轴迁移、逐渐成熟衰老最终在绒毛顶端脱落<sup>[1-5]</sup>。肠道黏膜上皮细胞稳态通过上皮细胞不断增殖与凋亡之间的平衡来维系，一般情况下凋亡处于低水平<sup>[6]</sup>。应用回肠代输尿管术重建尿路的连续性已有上百年的历史，在临床上取得了较好的疗效。回肠替代输尿管后绒毛萎缩变短，是一种适应性改变，然而，回肠的适应性改变与什么有关，是否为尿液环境促进肠上皮细胞的凋亡加速、破坏其稳态平衡所致，目前尚未见有关报道。在此次研究中，选取人正常肠上皮 HIEC 细胞，在培养基中分别加入不同比例的人工尿液，观察尿液对肠上皮细胞内凋亡因子半胱氨酸蛋白酶 3(Caspase-3)、Bax、Bcl-2 表达的影响，进一步探讨尿液环境是否促进肠上皮细胞的凋亡及其背后可能的机制。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学水平对比观察实验。

1.2 时间及地点 于 2018 年 7 月至 2019 年 3 月在贵州省人民医院中心实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 细胞与试剂 人正常肠上皮 HIEC 细胞株为 ATCC 来源；根据要求定制 pH 5.5，高浓度渗透压为 2 000 mOsm/(kg•H<sub>2</sub>O) 的人工尿液 (索莱宝, A6660)；Cell count Kit-8 细胞增殖试剂盒 (CK04, 500T) 购于日本同仁化工公司；DMEM 高糖培养基 (含谷氨酰胺和丙酮酸钠)、PBS、青、链霉素购于美国 HyClone 公司；胎牛血清 (Biological Industries, Israel)；FastStart Universal SYBR Green Master(Rox)(Roche, USA)；ECL 化学发光底物 (Bio-Rad, USA)；BCA 蛋白浓度测定试剂盒、蛋白 Marker 购于 Thermo 公司；一抗 Caspase-3、Bax、Bcl-2、β-actin 兔抗鼠多克隆抗体，抗兔、抗鼠荧光二抗购于英国 Abcam 公司。

1.3.2 主要仪器及设备 电泳槽购于美国 Bio-Rad 公司，

Stepone plus 荧光定量 PCR 仪购于美国 ABI 公司，SW-CJ-1FD 超净工作台购于中国苏净安泰公司，NanoDrop2000 超微量分光光度计购于美国 Thermo 公司。

1.4 方法

1.4.1 细胞培养 人正常肠上皮细胞株为 HIEC 细胞，在含有体积分数 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素的 DMEM 培养基内培养，置于 37 °C、体积分数 5%CO<sub>2</sub> 常规培养箱中培养，每一两天换培养液，细胞生长至 90% 融合时传代。

1.4.2 CCK-8 法检测肠上皮细胞抑制 将对数生长期 HIEC 细胞用胰蛋白酶消化，配制成细胞悬液 (浓度为 1×10<sup>8</sup> L<sup>-1</sup>)，按 5 000 细胞 / 孔接种于 96 孔板，每孔加 100 μL，置于 CO<sub>2</sub> (体积分数 5%) 培养箱中 37 °C 下培养 24 h 以贴壁。继续培养 24 h，取人工尿液分别用培养基按 0, 1 : 1, 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16, 1 : 32, 1 : 64, 1 : 128 稀释后加入 10 μL 各组孔内作为实验组，对照组采用纯培养基培养 (人工尿液与培养基比例为 0)。每个浓度的样本设 6 个重复，培养 72 h 后拍照观察。所有孔中加入 10 μL CCK-8 溶液，培养箱中孵育 1-4 h。使用酶标仪测定 450 nm 吸光度 (A) 值，不含细胞的培养基为空白组，按公式计算药物对细胞的抑制率。细胞抑制率 (%) = 1 - (A 实验组 - A 空白组) / (A 对照组 - A 空白组) × 100%。

1.4.3 免疫印迹 (Western blot) 法检测肠上皮细胞中 Caspase-3、Bax、Bcl-2 的蛋白表达 取人工尿液分别用培养基按 0, 1 : 8, 1 : 16, 1 : 32, 1 : 64, 1 : 128 稀释后加入 200 μL 各组孔内作为实验组，对照组加入 200 μL 纯培养基培养，培养周期结束，收集各组细胞。提取细胞蛋白后测定蛋白浓度，大致步骤：取 50 μg / 孔细胞蛋白进行凝胶电泳，常温下将电泳分离后的蛋白转膜于 PVDF 膜，适量 5% 脱脂牛奶室温下封闭 1 h，加入一抗 Caspase-3、Bax、Bcl-2 (1 : 5 000、1 : 8 000、1 : 1 000) 及内参 β-actin (1 : 5 000)，于 4 °C 孵育过夜。用 TBST 洗 5 次，每次 5 min，二抗 (1 : 10 000) 室温下摇床孵育 1 h。滴加新鲜配制的 ECL 混合溶液到膜的蛋白面，暗室曝光，显影、定影。iBrightv 1.4.0 对胶片进行

存档和分析, 分析靶带和内参的 A 值, 并以靶蛋白带 A 与  $\beta$ -actin A 比值表示蛋白表达量。

**1.4.4 采用 RT-PCR 法检测肠上皮细胞中 Caspase-3、Bax、Bcl-2 mRNA 表达情况** 使用 Trizol 进行总 RNA 抽提, Nanodrop 2000 检测 RNA 浓度及纯度。将浓度过高的 RNA 进行适当比例的稀释, 使其终浓度为 200  $\mu$ g/L, 后将 1  $\mu$ g 总 RNA 反转录合成 cDNA 作为模板, 荧光定量 PCR 试剂盒进行扩增, 按照试剂盒说明书步骤操作。PCR 扩增条件为 95  $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 95  $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60  $^{\circ}$ C 退火延伸 60 s, 循环 40 次, 熔解曲线 60  $^{\circ}$ C  $\rightarrow$  95  $^{\circ}$ C, 每 15 s 升温 0.3  $^{\circ}$ C。使用 HT7500 生物系统以及 SYBRGreen 的试剂盒, 选择  $\beta$ -actin 为内参基因, 用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法对样本基因进行表达差异相对定量分析。引物由 Servicebio 公司合成, 序列见表 1。

表 1 | PCR 引物序列

Table 1 | Primer sequences for PCR

基因	方向	引物序列 (5'→3')
$\beta$ -actin	正向	CAC CCA GCA CAA TGA AGA TCA AGA T
	反向	CCA GTT TTT AAA TCC TGA GTC AAG C
Bax	正向	TTT TGC TTC AGG GTT TCA TCC A
	反向	TGC CAC TCG GAA AAA GAC CTC
Bcl-2	正向	GGA GGA TTG TGG CCT TCT TTG
	反向	GCA TCC CAG CCT CCG TTA TC
Caspase-3	正向	GAA CTG GAC TGT GGC ATT GAG A
	反向	ATT CTG TTG CCA CCT TTC GG

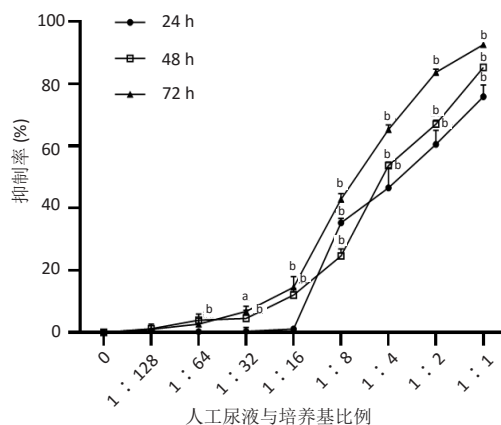
**1.5 主要观察指标** 各组培养 24, 48, 72 h, 用 CCK-8 法检测肠上皮细胞增殖情况, 采用 Western blot 法检测肠上皮细胞中 Caspase-3、Bax、Bcl-2 的蛋白表达水平, 采用 RT-PCR 法检测肠上皮细胞中 Caspase-3、Bax、Bcl-2 mRNA 的表达情况。

**1.6 统计学分析** 运用 SPSS 21.0 统计软件进行统计分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用单因素方差分析, 两两比较使用 LSD 检验,  $P < 0.05$  为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 CCK-8 法检测尿液环境对肠上皮细胞增殖的抑制率** 采用 CCK-8 法检测细胞凋亡情况, 见图 1, 与对照组相比, 发现人工尿液 1 : 128 组与其差异无显著性意义; 而当人工尿液的稀释比例降低时, 在人工尿液 1 : 64 的环境下, 48 h 可见细胞凋亡增加 [(3.98 $\pm$ 1.95)%],  $P < 0.01$ ; 在人工尿液 1 : 8 的环境下, 与对照组相比, 24, 48, 72 h 细胞抑制率 (35.32% $\pm$ 1.40)%, (24.65% $\pm$ 2.2)%, (42.85% $\pm$ 1.86)% 均显著增加 ( $P < 0.01$ ), 细胞凋亡以 72 h 效果更为明显。由此推断, 尿液环境可诱导肠上皮细胞凋亡, 且呈浓度梯度性。

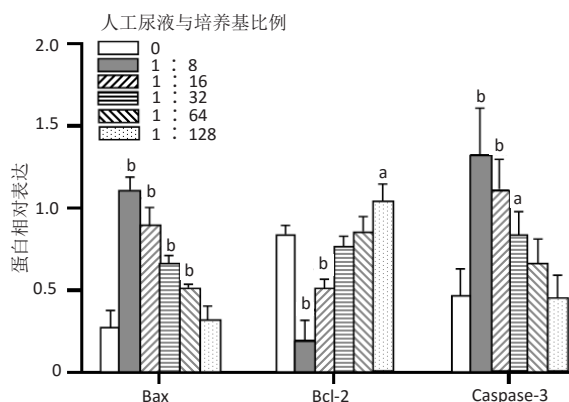
**2.2 不同浓度的尿液对肠上皮细胞内凋亡因子 Caspase-3、Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响** 如图 2, 与对照组比较, 1 : 8, 1 : 16, 1 : 32 和 1 : 64 各组 Bax 蛋白表达显著增高 ( $P < 0.01$ ), 其中 1 : 8 组表达量增高最大; 1 : 8 和 1 : 16 各组 Caspase-3 蛋白表达显著上升 ( $P < 0.01$ ), 1 : 32 组表达升高, 且差异有显著性意义 ( $P < 0.05$ ); 1 : 8 和 1 : 16 组 Bcl-2 蛋白表达显著下降 ( $P < 0.01$ ), 1 : 128 组 Bcl-2 蛋白表达升高,



图注: 与对照组 (人工尿液与培养基比例为 0, 即纯培养基对照组) 比较,  $^a P < 0.05$ ,  $^b P < 0.01$

图 1 | 不同浓度尿液中 HIEC 细胞的凋亡情况

Figure 1 | Apoptosis of human intestinal epithelial cells induced by urine at different concentrations



图注: 与对照组 (人工尿液与培养基比例为 0, 即纯培养基对照组) 比较,  $^a P < 0.05$ ,  $^b P < 0.01$

图 2 | 不同浓度尿液环境对 Caspase-3、Bax 及 Bcl-2 蛋白表达的影响

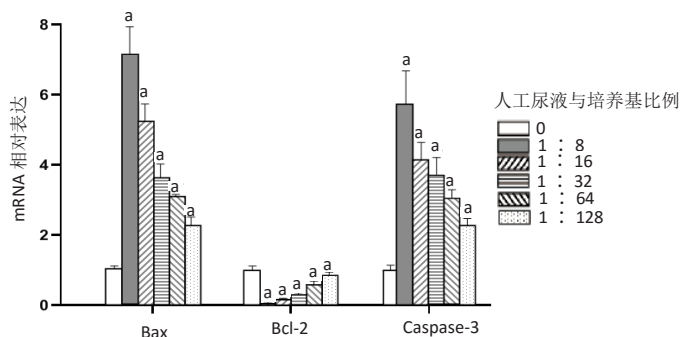
Figure 2 | Expression of Caspase-3, Bax and Bcl-2 proteins under urine environment at different concentrations

且差异有显著性意义 ( $P < 0.05$ )。因此, 只有达到一定浓度的尿液环境才能起到促进肠上皮细胞凋亡的作用, 不同浓度的尿液环境对肠上皮细胞的影响并不一致。

**2.3 不同浓度的尿液对肠上皮细胞内凋亡因子 Caspase-3、Bax、Bcl-2 mRNA 表达的影响** 如图 3 所示, 与对照组比较, 不同尿液浓度干预组 Caspase-3 和 Bax mRNA 表达显著增高 ( $P < 0.01$ ), Bcl-2 mRNA 表达显著降低 ( $P < 0.01$ ), 说明尿液环境浓度越高, 效果越佳。由此可知, 尿液对肠上皮细胞内凋亡因子 Caspase-3、Bax、Bcl-2 mRNA 表达的影响呈浓度依赖性。

## 3 讨论 Discussion

输尿管损伤临床上较为常见, 全段损伤往往不能自行愈合, 需要特殊处理。导致损伤的常见原因除创伤外, 还有输尿管结核、输尿管放射性损伤、慢性炎症及腹膜后纤维化等。输尿管全段损伤需要手术治疗, 且较为棘手, 在各种输尿管重建手术中, 回肠代输尿管术可以处置较长的输尿管段损伤,



图注: 与对照组(人工尿液与培养基比例为0,即纯培养基对照组)比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$

图3 | 不同浓度尿液环境对 Caspase-3、Bax 及 Bcl-2 mRNA 表达的影响

Figure 3 | mRNA expression of Caspase-3, Bax and Bcl-2 under urine environment at different concentrations

取得了较好的效果<sup>[7-8]</sup>,成为全段输尿管损伤的常用术式。此次研究探讨回肠代输尿管应用重建尿路过程中,影响肠上皮替代输尿管上皮的因素及其可能的作用机制,进而为该过程中肠道黏膜出现病理学改变提供实验依据。

肠上皮细胞是肠道黏膜屏障的重要组成部分, HIEC 细胞为人小肠上皮细胞,各种病理因素可引起肠上皮细胞损伤,肠道环境比尿道复杂,各种细菌和病因均可引起肠黏膜损伤及修复。相关基础研究表明,肠黏膜依靠位于肠腺隐窝的细胞不断增殖、分化及上皮细胞移行形成新的上皮细胞,从而促进黏膜修复<sup>[9]</sup>。回肠黏膜具有绒毛,绒毛表面上皮呈圆柱状,大多数为杯状细胞,也可见柱状上皮细胞和少许潘氏细胞<sup>[10]</sup>。输尿管上皮结构为移行上皮<sup>[11]</sup>,与小肠上皮结构具有一定的差异性。回肠替代输尿管后适应性改变,肠道黏膜在尿液的影响下出现绒毛萎缩变短,是否可能因为尿液对其稳态产生了影响?由于正常情况下,小肠肠液的 pH 值为 5-7,尿液的 pH 值范围在 5.5-6.5 之间<sup>[12-13]</sup>,酸碱环境大体相同, pH 值促进肠上皮细胞凋亡的可能性较小。因此,可能是尿液环境在回肠代输尿管适应性过程中加速肠上皮细胞凋亡,促进肠黏膜中的细胞增殖、分化及移行成新的上皮细胞以适应尿路环境。

考虑到人尿液的不稳定性以及不同时间、不同个体、正常人尿液的 pH 值和成分比例有一定差异。此次研究采取的人工尿液分别用培养基按 0, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 稀释后加入各组孔内,模拟回肠代输尿管术后适应性过程中尿液的影响。实验结果显示,与对照组比较, 1:8, 1:16, 1:32 和 1:64 各组 Bax/Bcl-2 蛋白表达增高, 1:8, 1:16 和 1:32 各组 Caspase-3 蛋白表达升高;与对照组比较,不同尿液浓度干预组 Caspase-3 和 Bax/Bcl-2 mRNA 表达升高;且随浓度梯度增高, mRNA 和蛋白表达逐渐升高。然而与对照组比较, 1:128 组 Bcl-2 蛋白表达升高,与 mRNA 表达结果不一致;同时,与蛋白表达结果相应, CCK-8 结果显示 1:128 组细胞凋亡无显著变化。综上所述,尿液环境促进肠上皮细胞凋亡,可能与升高凋亡因子 Caspase-3、Bax/Bcl-2 的表达

有关。众所周知, RT-PCR 检测 mRNA 的灵敏度较 Western blot 检测更高,并且 mRNA 翻译成蛋白质包括转录后加工、翻译、加工及修饰等多个层面,转录水平和翻译水平并不完全一致<sup>[14-15]</sup>,因此 mRNA 与蛋白表达结果不完全一致。蛋白质是行使生理功能的基本单位<sup>[16]</sup>,据此,在尿液环境中肠上皮细胞内 Caspase-3 和 Bax/Bcl-2 蛋白水平的变化可能影响肠上皮细胞细胞凋亡程序,进而促进肠上皮细胞凋亡,发生对新生环境的适应性改变。除 1:128 组以外,同一时间条件下,随着尿液浓度梯度的增高,肠上皮细胞内 mRNA 和蛋白表达逐渐升高,因此,肠上皮细胞所处环境尿液浓度越高,即与回肠代输尿管后适应性过程中影响因素越相似,肠上皮细胞凋亡越快。

Caspase-3 是半胱天冬酶级联反应的执行者,半胱天冬酶级联反应是凋亡诱导细胞死亡的关键步骤<sup>[17]</sup>。Caspase-3 的激活诱导特定底物的裂解,如 PARP,这是凋亡发生的关键<sup>[18]</sup>。此外, Bcl-2 家族蛋白比例的改变与线粒体内环境平衡失衡有关,这种失衡会导致细胞凋亡,促凋亡 Bax 水平的升高和 / 或抗凋亡 Bcl-2 水平降低均会导致线粒体膜电位丧失,从而启动细胞凋亡<sup>[19]</sup>。

Bax 是 Bcl-2 基因家族中的一员,与 Bcl-2 形成同源或异源二聚体。Bcl-2 家族在抑制细胞凋亡中起重要作用,在凋亡过程中主要表现为调控 Bax 蛋白表达增多, Bcl-2 蛋白表达减少, Bax/Bcl-2 比例上升, Bax 同源二聚体增多, Bcl-2 与 Bax 的异源二聚体减少<sup>[20-21]</sup>。当细胞受外界损失刺激时,凋亡信号能使 Bax 在线粒体外膜上的低聚,形成渗透性膜转移孔复合物,导致线粒体外膜通透性增加,建立线粒体膜离子通道,介导线粒体的释放反应,使细胞色素 C 可以进入线粒体与凋亡促进因子 1 和 Caspase-9 结合形成复合体,在 ATP 参与下,使 Caspase-3 等蛋白酶家族发生酶解级联激活,最后执行凋亡过程<sup>[21-24]</sup>。Bcl-2 则通过阻碍细胞色素 C 的释放,阻断 Caspase-3 的激活,抑制细胞凋亡<sup>[25]</sup>。因此,尿液环境可能通过影响细胞内 Bax 和 Bcl-2 蛋白的表达,经线粒体信号转导途径促进 Caspase-3 水解产生酶解级联反应,最后导致人正常肠上皮 HIEC 细胞的凋亡。

综上所述,此次研究发现尿液环境可促进人正常肠上皮 HIEC 细胞的凋亡,显著上调细胞内凋亡因子 Caspase-3、Bax/Bcl-2 蛋白及 mRNA 表达,其机制可能是通过调控细胞凋亡因子 Caspase-3、Bax/Bcl-2,进而促进肠上皮的适应性改变,加速肠上皮的化生,使回肠更好地替代输尿管。此次研究发现回肠代输尿管重建尿路过程,尿液环境是促进回肠适应性改变的其中一个因素,然而回肠代输尿管应用的适应过程复杂,是否有其他影响因素还需进一步研究,同时有关尿液环境促进回肠代输尿管应用是否有其他通路也有待研究。

作者贡献: 王振兴负责实验设计,徐彬、刘璇负责实验实施,杨秀书负责指标测定。

经费支持: 该文章接受了“贵州省科学技术厅资助项目(黔科合基

础 [2018]1100” 的基金资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明, 没有接受该器械的任何资助, 在课题研究和文章撰写过程, 不存在利益冲突。

**机构伦理问题:** 该研究方案的实施符合《赫尔辛基宣言》和贵州省人民医院对研究的相关伦理要求。

**写作指南:** 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

**文章查重:** 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

**文章外审:** 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合本刊发稿宗旨。

**生物统计学声明:** 文章统计学方法已经贵州省人民医院生物统计学专家审核。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0” 条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

#### 4 参考文献 References

[1] HAUSMANN M. How bacteria-induced apoptosis of intestinal epithelial cells contributes to mucosal inflammation. *Int J Inflamm.* 2010;26(5):1-9.

[2] ALTAY G, LARRAÑAGA E, TOSI S, et al. Self-organized intestinal epithelial monolayers in crypt and villus-like domains show effective barrier function. *Sci Rep.* 2019;9(1):1-14.

[3] HASE K, NAKATSU F, OHMAE M, et al. AP-1B-Mediated Protein Sorting Regulates Polarity and Proliferation of Intestinal Epithelial Cells in Mice. *Gastroenterology.* 2013;145(3):625-635.

[4] BLIKSLAGER AT. Small Intestinal Function. *Equine Acute Abdomen.* 2017:27-40.

[5] BUCKLEY A, TURNER JR. Cell biology of tight junction barrier regulation and mucosal disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018;10(1):a029314.

[6] ZHANG C, SHENG ZY, HU S, et al. The influence of apoptosis of mucosal epithelial cells on intestinal barrier integrity after scald in rats. *Burns.* 2002;28(8):731-737.

[7] ORDORICA R, WIEGAND LR, WEBSTER JC, et al. Ureteral replacement and onlay repair with reconfigured intestinal segments. *J Urol.* 2014; 191(5):1301-1306.

[8] WOLFF B, CHARTIER-KASTLER E, MOZER P, et al. Long-term functional outcomes after ileal ureter substitution: a single-center experience. *Urology.* 2011;78(3):692-695.

[9] LUISSINT AC, PARKOS CA, NUSRAT A. Inflammation and the intestinal barrier: leukocyte-epithelial cell interactions, cell junction remodeling, and mucosal repair. *Gastroenterology.* 2016;151(4):616-632.

[10] 杨希山, 周殿元, 冯福才, 等. 国人回肠粘膜的组织学研究 [J]. 解剖学杂志, 1987, 10(1):21-23.

[11] RIGAS JD, SMITH TJ, ELENA GORMAN M, et al. Primary ureteral giant cell sarcoma in a Pomeranian. *Veter Clin Pathol.* 2012;41(1):141-146.

[12] NIELSEN A B, BUUR A, LARSEN C. Bioreversible quaternary N-acyloxymethyl derivatives of the tertiary amines bupivacaine and lidocaine—synthesis, aqueous solubility and stability in buffer, human plasma and simulated intestinal fluid. *Eur J Pharm Sci.* 2005;24(5):433-440.

[13] LAI HC, CHANG SN, LIN HC, et al. Association between urine pH and common uropathogens in children with urinary tract infections. *J Microbiol Immunol Infect.* 2019;52(8):1-6.

[14] DE KLERK E, 'T HOEN PA. Alternative mRNA transcription, processing, and translation: insights from RNA sequencing. *Trends Genet.* 2015; 31(3):128-139.

[15] KIM DS, CHALLA S, JONES A, et al. PARPs and ADP-ribosylation in RNA biology: from RNA expression and processing to protein translation and proteostasis. *Genes Dev.* 2020;34(2):302-320.

[16] PETSKO GA, RINGE D. Protein structure and function. *New Science Press,* 2004.

[17] ZAMARAEV AV, KOPEINA GS, PROKHOROVA EA, et al. Post-translational modification of caspases: the other side of apoptosis regulation. *Trends Cell Biol.* 2017;27(5):322-339.

[18] VIZETTO-DUARTE C, CUSTODIO L, GANGADHAR KN, et al. Isolololide, a carotenoid metabolite isolated from the brown alga *Cystoseira tamariscifolia*, is cytotoxic and able to induce apoptosis in hepatocarcinoma cells through caspase-3 activation, decreased Bcl-2 levels, increased p53 expression and PARP cleavage. *Phytomedicine.* 2016;23(5):550-557.

[19] PAN Y, YE C, TIAN Q, et al. miR-145 suppresses the proliferation, invasion and migration of NSCLC cells by regulating the BAX/BCL-2 ratio and the caspase-3 cascade. *Oncol Lett.* 2018;15(4):4337-4343.

[20] YANG X, ZHANG M, WEI M, et al. MicroRNA-216a inhibits neuronal apoptosis in a cellular Parkinson's disease model by targeting Bax. *Metab Brain Dis.* 2020;5(3):1-9.

[21] XU G, KUANG G, JIANG W, et al. Polydatin promotes apoptosis through upregulation the ratio of Bax/Bcl-2 and inhibits proliferation by attenuating the  $\beta$ -catenin signaling in human osteosarcoma cells. *Am J Transl Res.* 2017;23(1):462-469.

[22] OPFERMAN JT, KOTHARI A. Anti-apoptotic BCL-2 family members in development. *Cell Death Differ.* 2018;25(1):37-45.

[23] ASHKENAZI A, FAIRBROTHER W J, LEVERSON JD, et al. From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors. *Nature Rev Drug Discov.* 2017;16(4):273-284.

[24] KARIMZADEH S, HOSSEINKHANI S, FATHI A, et al. Insufficient Apaf-1 expression in early stages of neural differentiation of human embryonic stem cells might protect them from apoptosis. *Eur J Cell Biol.* 2018; 97(2):126-135.

[25] SI L, ZHENG L, XU L, et al. Dioscin suppresses human laryngeal cancer cells growth via induction of cell-cycle arrest and MAPK-mediated mitochondrial-derived apoptosis and inhibition of tumor invasion. *Eur J Pharmacol.* 2016;774(5):105-117.

(责任编辑: GD, ZN, DL)