

创伤性脓毒症过程中外周血中性粒细胞凋亡的实验研究

隰建成 周宝桐 蒋礼先 姜小国 孙同柱 杨毅

【摘要】目的 探讨脓毒症大鼠外周血中性粒细胞凋亡的变化规律。**方法** 采用盲肠结扎穿孔术(CLP)复制脓毒症大鼠模型,144 只大鼠随机分为正常对照组、假手术组及 CLP 术后 2、6、12、24、48 和 72 h 组。取大鼠腹主动脉血,采用原位末端脱氧核苷酸转移酶介导的脱氧尿嘧啶三磷酸缺口末端标记法(TUNEL)检测中性粒细胞的凋亡。**结果** CLP 术后早期循环血中性粒细胞的凋亡受抑,TUNEL 染色凋亡细胞阳性率低于 5.00%,之后开始增加,CLP 后 48 h 凋亡细胞阳性率为(48.33±12.53)%,术后 72 h 凋亡率又降至接近正常水平。**结论** 脓毒症急性期产生的大量中性粒细胞以死亡为主要途径;当机体转向逐渐恢复时,中性粒细胞以凋亡为主要途径。

【关键词】 脓毒症; 中性粒细胞; 外周血; 细胞凋亡

Apoptosis of neutrophil in peripheral blood in experimental sepsis XI Jian-cheng*, ZHOU Bao-tong, JIANG Li-xian, JIANG Xiao-guo, SUN Tong-zhu, YANG Yi. * Burns Institute, the 304th Hospital Affiliated to General Hospital of PLA, Beijing 100037, China (XI Jian-cheng works in Department of Orthopaedics, the 309th Hospital of PLA, Beijing 100091, China)

【Abstract】Objective To evaluate the changes in apoptosis of neutrophil in peripheral blood in sepsis in rats. **Methods** The rat sepsis model was reproduced by cecum ligation and puncture (CLP). One hundred and forty-four rats were randomly divided into normal control group, sham operation group and 2, 6, 12, 24, 48, 72 hours after CLP groups. Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) was used to identify neutrophil apoptosis. **Results** In early period after CLP, neutrophil apoptosis in peripheral blood was limited with a positive rate of less than 5.00%. The positive rate rose to (48.33±12.53)% at 48 hours, and it began to lower, approaching the normal level at 72 hours after CLP. **Conclusion** Death is the main pathway of loss of neutrophils which are produced in the acute phase of sepsis, and apoptosis is the main pathway of loss of neutrophil in the later phase of sepsis.

【Key words】 sepsis; neutrophil; peripheral blood; apoptosis

中性粒细胞是机体非特异性防御反应的重要执行者,在早期炎症反应中扮演重要角色。中性粒细胞的早期活化对于创伤愈合、限制微生物入侵是必需的,但过度、持续地活化将产生大量活性氧和酶类,并溢出细胞外,不仅引起局部损伤,且会引起全身组织损伤,同时体内单核/巨噬细胞系统过度活化产生的炎性因子及其“瀑布效应”,将加重上述损伤。本研究拟采用盲肠结扎穿孔术(CLP)模型以探讨大鼠脓毒症过程中中性粒细胞凋亡的变化规律。

1 材料与方法

1.1 动物及分组:实验用健康雄性 Wistar 大白鼠,体重 180~220 g,由军事医学科学院动物中心提供。实验前在本院动物室适应性饲养 1~2 周,实验前后自由饮食。144 只大鼠随机分为 8 组:对照组(即国家自然科学基金项目;全军“十五”指令性科研课题基金资助项目(01L081)作者单位:100037 北京,解放军总医院第三〇四临床部烧伤研究所(隰建成(现在北京解放军总医院第三〇九临床部骨科工作),周宝桐,蒋礼先,姜小国,孙同柱),病理科(杨毅)

作者简介:隰建成(1968-),男(汉族),河北省保定市人,博士研究生,主治医师,已发表学术论文 16 篇。

常动物组),CLP 术后 2、6、12、24、48 和 72 h 组,假手术组,每组 18 只动物。

1.2 模型制备:采用 CLP 方式复制脓毒症模型^[1]。术前、活杀前各测肛温 1 次。碘酒、乙醇消毒腹部皮肤,质量分数为 3%的戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔内注入麻醉,4 号丝线结扎盲肠根部,保留血供,18 号针头于盲肠末端穿孔 2 个,挤出肠内容物少许,乙醇棉球拭净,逐层缝合腹壁。

1.3 标本处理及中性粒细胞分离:常规消毒大鼠腹部皮肤,打开腹腔,于实验的各时间点无菌取腹主动脉血各 3~4 ml,每 3 只大鼠的合成一管,共约 10~12 ml,立即用于分离中性粒细胞及其 DNA 的提取。将所取大鼠的外周血加入含有肝素(终浓度 20 kU/L)的 5 ml 塑料离心管中,混匀后加入等量生理盐水,轻轻摇动;再加入质量分数为 0.5%的甲基纤维素(稀释血:甲基纤维素=4:1),混匀,室温静置 30 min;将富含白细胞的上层部分小心吸出,置于另一塑料离心管中(注意不要搅动下层红细胞),离心(4℃,1 500 r/min,2 min),弃上清,沉淀

轻轻悬起后,加入双蒸水 5 ml,轻轻抖动几下,立即加入质量分数为 1.8% 的 NaCl 5 ml,混匀后离心(4 °C, 3 000 r/min, 3 min)。重复上述步骤 1~2 次,直至红细胞溶解彻底,上清液清亮,无微红色呈现。弃上清,沉淀以 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS) 4 ml 混悬;10 ml 尖底刻度离心管中先加入 5 ml 淋巴细胞分离液,然后将细胞混悬液轻轻加到淋巴细胞分离液上层,离心(4 °C, 2 000 r/min, 20 min)。弃去上清和单个核细胞层,用 0.01 mol/L PBS 洗离心管底部中性粒细胞 2 遍,备用。

1.4 中性粒细胞基因组 DNA 的提取:取 2×10^6 细胞离心,弃上清,以 SE(pH 8.0, 75 mmol/L NaCl, 25 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA))洗 1 遍,沉淀悬于 20 μ l SE 中;加入 500 μ l DNA 抽提缓冲液,轻柔颠倒混匀,50 °C 水浴箱过夜。加入等体积的酚:氯仿混合液(1:1),轻轻混合后离心(4 °C, 10 000 r/min, 10 min);吸取上层 DNA 部分,再以等体积的氯仿:异戊醇(24:1)抽提,离心(4 °C, 10 000 r/min, 10 min);吸取上层部分,加入 1/10 体积 3 mol/L NaCl(pH 5.2),轻轻混匀,再加入 3/5 体积异丙醇,来回颠倒混匀,-20 °C 静置 3 h。离心(4 °C, 15 000 r/min, 15 min),弃上清,沉淀以体积分数为 70% 和 100% 的无水乙醇各洗 1 遍,待乙醇挥发干净后,以 15 μ l TE(pH 8.0, 10 mmol/L Tris · Cl, 1 mmol/L EDTA)溶解 DNA 沉淀,-20 °C 保存待用。

1.5 原位末端脱氧核苷酸转移酶介导的脱氧尿嘧啶三磷酸缺口末端标记法(TUNEL)检测中性粒细胞凋亡。

1.5.1 细胞固定:吸取中性粒细胞悬液置于载玻片上,甩片机甩片(2 000 r/min, 2 min),将标本晾干,以新鲜配制的多聚甲醛溶液(4% PBS, 0.2 mol/L, pH 7.2)固定 30 min(室温),封口膜包裹,4 °C 保存。

1.5.2 细胞渗透作用:以 PBS 浸泡载物片 1 遍(5 min),滴加质量分数为 0.1% 的 Triton X-100 于标本上,置冰上(4 °C)孵育 2 min。

1.5.3 标记:用 PBS 浸泡 2 遍(每次 5 min),将标本晾干,加入 50 ml TUNEL 反应混合物,载玻片在湿盒中 37 °C 条件下孵育 60 min,用 PBS 清洗载玻片 3 遍(每次 5 min)。

1.5.4 信号转导和分析:将标本周围晾干,向标本中加入 50 ml Converter-AP 转换剂,载玻片在湿盒中 37 °C 下孵育 30 min,用 PBS 清洗 3 遍,加入 50~100 ml 底物溶解液(AP-Red),室温下孵育 5~10 min,用 PBS 清洗 3 遍,载玻片标本覆盖玻璃

片(可加 PBS 或甘油),于光镜下分析。

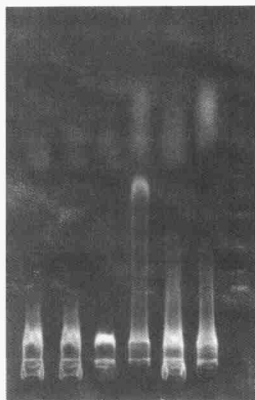
1.6 凝胶电泳:用 $5 \times$ TAE(pH 8.0, Tris 碱 12.1 g, 丁乙酸 2.855 ml, 0.5 mol EDTA 5 ml, 加双蒸水至 500 ml)制备琼脂糖凝胶,微波炉加热溶解后冷却至 60 °C 左右,加入二溴乙烷(EB, 终浓度为 0.5 g/L),铺胶,厚 5 mm,凝固后置电泳槽中。将提取的中性粒细胞基因组 DNA 产物与载样缓冲液(5:1)混合后取 12 μ l 加至样品槽中,在 $1 \times$ TAE 中电泳 1 h(恒压 3~4 V/cm),电泳完毕,在紫外灯下观察结果,并照相。

1.7 扫描定量:底片用计算机图像分析仪分析,以灰度表示中性粒细胞基因组 DNA 产物量。

1.8 统计学处理:各项指标均以均值士标准误($\bar{x} \pm s$)表示,数据应用 SAS、Excel 统计软件在微机上进行分析,不同资料分别进行 *t* 检验、方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 我们用提取的中性粒细胞基因组 DNA 进行琼脂糖(质量分数为 2%)凝胶电泳,观察凋亡细胞特征性电泳图谱(DNA-Ladder)发现:正常及术后 12 h 前无典型的 DNA-Ladder(均 0/6);24、48 和 72 h 均可出现典型的 Ladder,其阳性率以术后 48 h 最高,与正常组比较, $P < 0.05$,3 组 DNA 电泳阳性率分别为 16.67%(1/6)、66.67%(4/6)和 33.33%(2/6,图 1)。



自左至右分别为正常组、CLP 术后 6、12、24、48 和 72 h 组 DNA Marker

图 1 CLP 术后循环血中性粒细胞 DNA 电泳

Figure 1 DNA electrophoresis of neutrophil in systemic blood after CLP

2.2 TUNEL 染色:应用 TUNEL 观察术后各时间点中性粒细胞甩片的 6 个不同视野,对各时间点凋亡率与正常中性粒细胞凋亡率进行两两对比发现,只有 CLP 术后 24 h 和 48 h 组与正常组比较差异有显著性(P 均 <0.05)外,其余各组均无统计学意义。

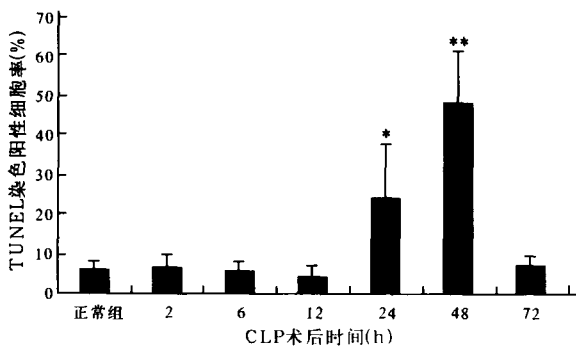
正常组外周血中性粒细胞凋亡 TUNEL 染色可见少数中性粒细胞的细胞核染成红色,且多为多型核细胞(苏木素衬染为蓝色)的核区,凋亡细胞阳性率为 $(6.17 \pm 1.94)\%$;CLP 术后 12 h 凋亡明显受抑,只有少数中性粒细胞的细胞核染成红色,阳性率低于 5.00% ;术后 48 h 循环血中性粒细胞凋亡明显加速,多数中性粒细胞胞核染成红色,阳性率为 $(48.33 \pm 12.53)\%$;术后 72 h 凋亡率又降至接近正常水平(表 1,图 2,彩色插页图 3~7)。

表 1 CLP 术后循环血中性粒细胞凋亡 TUNEL 染色阳性细胞率($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Positive rate of neutrophil apoptosis by TUNEL in systemic blood after CLP ($\bar{x} \pm s$)

组别	凋亡率(%)	组别	凋亡率(%)
正常组	6.17±1.94	CLP 术后 24 h 组	18.17±7.41*
CLP 术后 6 h 组	6.00±2.45	CLP 术后 48 h 组	48.33±12.53**
CLP 术后 12 h 组	4.83±2.32	CLP 术后 72 h 组	7.20±2.86

注:与正常组比较:* $P<0.05$,** $P<0.01$



注:与正常组比较:* $P<0.05$,** $P<0.01$

图 2 CLP 术后各时间点循环血中性粒细胞凋亡 TUNEL 染色阳性细胞率

Figure 2 Positive rate of neutrophil apoptosis by TUNEL in systemic blood at every time after CLP

3 讨论

创伤后的炎症反应是一个动态的过程,这一过程是致炎因素和抗炎因素相互抗衡的结果。中性粒细胞是炎症反应的重要标志和机体防御系统的重要组成部分,在机体遭受创伤或感染时大量增殖、分化、成熟,并经血流进入损伤区,在炎症的发生、发展和转归中发挥重要作用。中性粒细胞死亡的延迟与细胞介导的组织损伤有关^[2]。如中性粒细胞发生凋亡,则可被巨噬细胞或组织细胞识别并吞噬,通过凋

亡方式清除炎症灶内的中性粒细胞是限制组织损伤、有利炎症吸收的重要机制^[3,4]。

Rumalla 等^[5]检测了 13 例冠状动脉旁路移植术患者术前及术后 20 min、1 d 时外周血中性粒细胞的凋亡及中性粒细胞相关受体,如肿瘤坏死因子受体(TNFR)和中性粒细胞(CD95)、细胞因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、IL-8、IL-10 和 TNF 可溶性受体(sTNFR1 和 sTNFR2)。结果发现,术后 1 d 自发的和 Fas 介导的中性粒细胞凋亡水平降低了 80%,中性粒细胞 CD95 水平升高,但中性粒细胞 TNFR 的表达无变化。甲基泼尼松龙治疗不能调节中性粒细胞凋亡水平和免疫细胞受体的表达,但能降低术后 IL-6 分泌、提高 IL-10 的分泌。Sookhai 等^[6]抽取健康志愿者和全身炎症反应综合征(SIRS)患者的血液,在体外给予不同剂量的多巴胺和多巴胺 D-1 受体拮抗剂非诺多泮,利用 DNA 染色法检测中性粒细胞凋亡,通过呼吸爆发功能、吞噬功能及 CD11a、CD11b 和 CD18 受体的表达,未检测中性粒细胞的功能。结果发现,SIRS 患者的中性粒细胞凋亡明显延迟;凋亡经多巴胺可诱导两组中性粒细胞凋亡的发生;SIRS 患者的中性粒细胞消化和自杀功能均降低,多巴胺可明显提高吞噬细胞的功能,非诺多泮不能诱导中性粒细胞凋亡的发生。提示多巴胺可能通过中性粒细胞的非血流动力学致凋亡机制在 SIRS 过程中起作用。

关于中性粒细胞凋亡的影响因素,Nolan 等^[7]认为,脂多糖(LPS)和 TNF- α 能提高中性粒细胞核 P65 和 TNF 受体相关因子(TRAFs)的 mRNA 水平;中性粒细胞的凋亡可被 LPS、TNF- α 所抑制;与核转录因子- κ B(NF- κ B)抑制剂 PSI-1 一起孵育后的细胞可阻断 LPS、TNF- α 诱导的中性粒细胞凋亡抑制以及细胞核 P65 和 TRAF-1 mRNA 的诱导。表明 LPS、TNF- α 所致的中性粒细胞凋亡抑制和 TRAF-1 诱导依赖 NF- κ B。Harter 等^[8]认为,脓毒症过程中中性粒细胞凋亡的减少在多器官功能衰竭的发病机制中起一定的作用,参与凋亡调节的 Bcl-2 蛋白表达变化可能有助于脓毒症患者中性粒细胞凋亡的失衡。

在本实验中,我们观察了活体状态下正常大鼠和 CLP 后循环血中性粒细胞的凋亡规律。自 1980 年 Wyllie 报道,胸腺细胞发生凋亡时,其 DNA 琼脂糖电泳呈特征性“梯状”条带(Ladder)后,人们一直把这一现象视为细胞凋亡的生化特征。这是由

于核酸内切酶(endonuclease)将核小体之间的连接切割成 180~200 bp 整数倍的寡聚核苷酸的片段,因各片段分子质量大小不等,故在电泳场中呈现出“Ladder”现象。尽管不是所有的凋亡细胞都出现“梯状”条带,但是这仍不失为一经典的方法。应用琼脂糖凝胶电泳法发现,提取中性粒细胞的 DNA 后,48 h 电泳阳性(出现典型 Ladder)率最高;同时,应用 TUNEL 染色法也观察到了凋亡细胞的特征性核酸染色。TUNEL 染色法原理为显色剂与凋亡细胞核酸的缺口末端结合而显色,从而可区别凋亡细胞与正常细胞。由于我们应用的是 AP-Red,故凋亡细胞呈现为红色。结果显示:正常情况下,中性粒细胞自然凋亡率为(6.17±1.94)%;创伤打击(CLP)早期,中性粒细胞的凋亡未见明显增加,反而明显受抑(12 h),48 h 后才出现凋亡率的显著增加,术后 72 h 凋亡率下降、几乎接近正常水平,6、12、24、48 和 72 h 的凋亡率分别为(6.00±2.45)%、(4.83±2.32)%、(18.17±7.41)%、(48.33±12.53)%和(7.20±2.86)%。为减少人为误差,我们将各时间点凋亡率与正常中性粒细胞凋亡率作两两比较发现,24 h 组差异有显著性,48 h 组差异非常显著,其余各组则无统计学意义。比较 TUNEL 染色法和琼脂糖凝胶电泳法,在显示中性粒细胞凋亡方面,前者更敏感,但因人为因素有时可造成染色效果欠佳,反而不如后者直观,如果能同时应用流式细胞仪,准确率将更高。

本研究结果提示,脓毒症急性期内,中性粒细胞凋亡受到抑制,使得中性粒细胞寿命延长,得以更好地发挥抗炎功能;但在炎症局部因中性粒细胞大量聚积激活,死亡的中性粒细胞内蛋白酶类的溢出以及巨噬细胞系统(MO/Mφ)活化产生大量细胞因子及其“瀑布效应”,不仅引起局部损伤,而且会引起全

身组织损伤,这与脓毒症早期的功能损害明显相关。术后 48 h 中性粒细胞凋亡率明显增加(这与凋亡基因的启动相关),炎症反应也逐渐减轻,大量中性粒细胞以程序性细胞死亡(PCD)方式清除,白细胞计数也相应较低。

我们认为,脓毒症急性期(24 h 内)产生的大量中性粒细胞以死亡为主要途径,脏器功能损害明显,死亡率也较高。当中性粒细胞以凋亡为主要途径时,标志着机体转向逐渐恢复的过程。因此,为预防多器官功能障碍综合征(MODS)的发生,应重视脓毒症早期的治疗,控制炎症过程中主要的炎性细胞中性粒细胞的凋亡,以逆转炎症过程的走向。

参考文献:

- 1 Baker C C, Chaudr I H, Gains H D, et al. Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in murine cecal ligation and puncture model[J]. *Surgery*, 1983, 94: 331-342.
- 2 Haslett C. Granulocyte apoptosis and inflammatory disease[J]. *Br Med Bull*, 1997, 53: 669-683.
- 3 Meager L C, Savil J S, Baker A, et al. Phagocytosis of apoptotic neutrophils does not induce macrophage release of thromboxane B2[J]. *J Leukocyte Biol*, 1992, 52: 269-273.
- 4 Lee A, Whyte M K B, Haslett C. Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators[J]. *J Leukocyte Biol*, 1993, 54: 283-288.
- 5 Rumalla V, Calvano S E, Spotnitz A J, et al. The effects of glucocorticoid therapy on inflammatory responses to coronary artery bypass graft surgery[J]. *Arch Surg*, 2001, 136: 1039-1044.
- 6 Sookhai S, Wang J H, McCourt M, et al. Dopamine induces neutrophil apoptosis through a dopamine D-1 receptor-independent mechanism[J]. *Surgery*, 1999, 126: 314-322.
- 7 Nolan B, Kim R, Duffy A, et al. Inhibited neutrophil apoptosis: proteasome dependent NF-kappaB translocation is required for TRAF-1 synthesis[J]. *Shock*, 2000, 14: 290-294.
- 8 Harter L, Mica L, Stocker R, et al. Mcl-1 correlates with reduced apoptosis in neutrophils from patients with sepsis[J]. *J Am Coll Surg*, 2003, 197: 964-973.

(收稿日期:2005-03-29 修回日期:2005-08-29)

(本文编辑:李银平)

• 启事 •

爱尔血液灌流学术研讨会暨第九届全国学习班通知

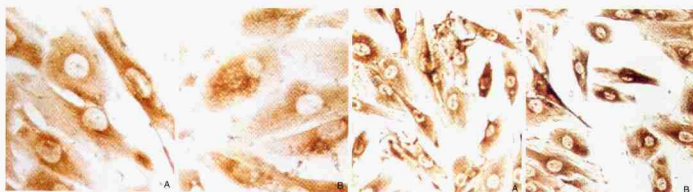
爱尔血液灌流学术研讨会暨学习班在天津、江苏、湖南等地已成功举办了 8 届,学员反映良好。为进一步提高血液灌流整体水平,我厂将于 2005 年 9 月 23-28 日与清华大学第一附属医院在北京联合举办第九届全国学习班,届时将邀请郑法雷、王质刚、段钟平等京、津著名血液净化专家进行讲座与学术研讨。主要研讨内容是血液灌流领域内的理论、技术与实践。学习注重理论与实践相结合,学习期间安排见习,并可获得中华医学会 I 类继续医学教育学分 5 分。

会议时间:2005 年 9 月 23(全天报到)—28 日(撤离)。报名截止日期:2005 年 9 月 10 日。会议地点:北京普天宾馆(北京市朝阳区将台路 2 号)。会务费:600 元(含资料费、学分证费),学员食宿统一安排,费用自理。联系地址:河北省廊坊市建国道 158 号;邮编:065000;联系人:徐飞;手机:13082070760;电话:(0316)2021113-6304(兼传真)。

(廊坊市爱尔血液净化器材厂)

Fas和FasL在Na⁺/H⁺交换器-1抑制诱导缺氧大鼠肺动脉平滑肌细胞凋亡中的作用

(正文见515页)



A: PA细胞, B: PRZ细胞

图1 转基因后细胞Fas蛋白免疫组化染色(DAB, ×400)

Figure 1 Immunohistochemical staining of Fas protein in cells transfected with NHE-1 ribozyme gene (DAB, ×400)

A: PA细胞, B: PRZ细胞

图2 转基因后细胞FasL蛋白免疫组化染色(DAB, ×400)

Figure 2 Immunohistochemical staining of FasL protein in cells transfected with NHE-1 ribozyme gene (DAB, ×200)

创伤性脓毒症过程中外周血中性粒细胞凋亡的实验研究

(正文见561页)



图3 循环血中性粒细胞凋亡TUNEL染色正常组, 可见少数中性粒细胞的胞核染成红色, 阳性率为6.17% (TUNEL, ×400)

Figure 3 Normal group of PMN apoptosis by TUNEL stain in systemic blood. It was seen that few cell nuclei of neutrophil were stained red colour, the positive rate was 6.17% (TUNEL, ×400)



图4 循环血中性粒细胞凋亡TUNEL染色正常组, 可见着色部位为细胞核的一端 (TUNEL, ×1 000)

Figure 4 Normal group of neutrophil apoptosis by TUNEL stain in systemic blood. It's seen that the stained site was on one side of cell nuclear (TUNEL, ×1 000)



图5 CLP术后12 h, 循环血中性粒细胞凋亡明显受抑, 只有少数中性粒细胞胞核染成红色, 阳性率为4.83% (TUNEL, ×400)

Figure 5 neutrophil apoptosis in systemic blood was restrained obviously 12 hours after CLP, the positive rate was 4.83% (TUNEL, ×400)

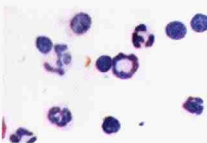


图6 CLP术后48 h, 循环血中性粒细胞凋亡明显加速, 多数中性粒细胞胞核染成红色, 阳性率为48.33% (TUNEL, ×400)

Figure 6 Neutrophil apoptosis in systemic blood was accelerated obviously 48 hours after CLP, more cell nuclei of neutrophil were stained red colour, the positive rate was 48.33% (TUNEL, ×400)

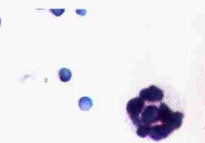


图7 CLP术后48 h, 循环血中性粒细胞凋亡 (TUNEL, ×1 000)

Figure 7 Neutrophil apoptosis stain in systemic blood 48 hours after CLP (TUNEL, ×1 000)