

多器官功能障碍综合征患者外周血单个核细胞凋亡的研究

梁艳冰 陈娟 马中富 唐皓 叶海宁 熊艳 詹红

【摘要】 目的 观察多器官功能障碍综合征(MODS)患者外周血单个核细胞(PBMCs)凋亡及其Bcl-2和p53的mRNA表达。方法 MODS患者25例为MODS组,18名健康志愿者为正常对照组。采用流式细胞仪、电子显微镜、荧光显微镜、DNA琼脂糖凝胶电泳法,观察患者确诊48h内及正常对照组的PBMCs凋亡;采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测PBMCs Bcl-2和p53的mRNA表达。结果 MODS患者PBMCs出现典型的细胞凋亡形态学改变,其凋亡率明显高于对照组[(25.4±9.2)%比(15.9±6.8)% $P<0.01$];MODS组的PBMCs凋亡细胞数明显高于正常对照组[(1.040±0.096)个/高倍视野比(0.235±0.028)个/高倍视野, $P<0.05$]。MODS组PBMCs的Bcl-2 mRNA表达量明显低于正常对照组(0.11±0.09比0.19±0.06, $P<0.05$);p53 mRNA表达量明显高于正常对照组(0.45±0.09比0.25±0.12, $P<0.05$)。结论 MODS患者PBMCs凋亡异常增高,Bcl-2 mRNA表达下调,p53 mRNA表达上调。提示MODS患者存在细胞凋亡异常,凋亡相关基因表达异常。

【关键词】 多器官功能障碍综合征; 外周血; 单个核细胞; 细胞凋亡; Bcl-2; p53; 基因表达

Study of apoptosis of peripheral blood mononuclear cells in patients with multiple organ dysfunction syndrome LIANG Yan-bing*, CHEN Juan, MA Zhong-fu, TANG Hao, YE Hai-ning, XIONG Yan, ZHAN Hong. * Department of Emergency, the First Affiliated Hospital of Zhongshan University, Guangzhou 510080, Guangdong, China

Corresponding author: MA Zhong-fu (Email: ma_zf@163.net)

【Abstract】 **Objective** To study apoptosis of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in patients with multiple organ dysfunction syndrome (MODS) and its associated gene Bcl-2 and p53 expression. **Methods** Twenty-five patients with MODS and 18 healthy volunteers were enrolled for the study. Flow cytometry assay, electron microscopy, acridine orange-ethidium bromide staining and fluorescence microscopy, DNA agarose gel electrophoresis were used to identify and quantify apoptosis of PBMCs. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to quantify Bcl-2 mRNA and p53 mRNA expression. **Results** Typical morphological features of apoptotic PBMCs were observed in the patients. The apoptosis rate in MODS group was (25.4±9.2)%, and it was higher than that of control group (15.9±6.8)% ($P<0.01$). The number of apoptotic cells was (1.040±0.096)/high power field in MODS group, and it was higher than that in control group (0.235±0.028)/high power field ($P<0.05$). Bcl-2 mRNA expression of PBMCs in patients was significantly lower than that of healthy volunteers (0.11±0.09 vs. 0.19±0.06, $P<0.05$), while p53 mRNA expression was higher in patients than that of healthy volunteers (0.45±0.09 vs. 0.25±0.12, $P<0.05$). **Conclusion** PBMCs apoptosis in patients with MODS is increased abnormally. The expression of Bcl-2 mRNA in patients is decreased while p53 mRNA expression is increased. The results suggest that abnormal apoptosis of monocytes as well as abnormal expression of apoptosis associated genes occur in patients with MODS.

【Key words】 multiple organ dysfunction syndrome; peripheral blood; mononuclear cell; apoptosis; Bcl-2; p53; gene expression

外周血单个核细胞(PBMCs)被认为是参与多器官功能障碍综合征(MODS)发生和发展的重要细胞,在创伤、感染等致病因素作用下异常活化,出现

功能和数量异常。细胞凋亡是维持细胞数目稳态及其功能的重要生理机制,因此我们推测,MODS患者PBMCs可能存在细胞凋亡异常,其Bcl-2和p53的基因表达可能异常。现将我们的研究报告如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象:选择符合1995庐山全国危重病急救医学学术会议制定的MODS病情分期诊断及严重程度评分标准^[1]的危重患者25例(MODS组),其中心肺复苏术后5例,手术创伤后9例,严重感染脓毒症9例,失血性休克2例。对照组为与患者组年

基金项目:广东省医学科学基金资助项目(A2003176);广州市科委重点攻关课题(2001-Z-130-02)

作者单位:510080 广州,中山大学附属第一医院急诊科(梁艳冰,马中富,唐皓,叶海宁,熊艳,詹红),SICU(陈娟)

通讯作者:马中富,教授,硕士研究生导师,主任医师(Email: ma_zf@163.net)

作者简介:梁艳冰(1968-),女(汉族),广东南海人,医学硕士,主治医师,研究方向为MODS的基础与临床。

龄、性别相匹配的健康志愿者 18 名(正常对照组)。两组对象均未接受过抗肿瘤药物治疗、放射治疗和激素治疗,排除器官移植患者、艾滋病患者、粒细胞减少症者。两组临床资料比较见表 1。

表 1 两组临床资料比较

Table 1 Comparison of clinical data between two groups

组别	例数	年龄 ($\bar{x} \pm s$, 岁)	性别(例)		血白细胞计数 ($\bar{x} \pm s, \times 10^9/L$)	淋巴细胞计数 ($\bar{x} \pm s, \times 10^9/L$)	淋巴细胞比例 ($\bar{x} \pm s, \%$)
			男	女			
MODS 组	25	48.7 \pm 6.2	16	9	16.63 \pm 9.04	2.13 \pm 1.28	15.3 \pm 6.3
正常对照组	18	46.2 \pm 3.8	10	8	6.87 \pm 1.27 [#]	2.19 \pm 0.47	32.3 \pm 6.4 [#]

注:与 MODS 组比较;[#] $P < 0.05$

1.2 研究方法

1.2.1 PBMCs 制备:采集 MODS 患者确诊 48 h 内外周静脉血,健康志愿者采晨起空腹静脉血。采血量 10 ml,用密度梯度离心法分离获得 PBMCs。

1.2.2 电镜观察细胞凋亡:将 PBMCs 固定、包埋,超薄切片机切片,以醋酸铀-枸橼酸铅双重染色,电镜下寻找凋亡细胞并照相。

1.2.3 吖啶橙(AO)-溴化乙锭(EB)染色,荧光显微镜观察细胞凋亡:取 $1 \times 10^6/L$ PBMCs 细胞悬液 25 μ l,加入 100 mg/L 的 AO 和 EB 染液各 5 μ l,室温染色 10 min,取 10 μ l 滴于载玻片上,用荧光显微镜于 340 nm 紫外光下观察、照相。PBMCs 凋亡积分的计算:计数 20 个视野($\times 400$)的凋亡细胞数,计算每高倍视野(high power field, HPF)中凋亡细胞数的均值,用“个/HPF”表示。

1.2.4 钙结合蛋白 V/碘化丙锭(Annexin V/PI)染色,流式细胞仪检测细胞凋亡:按试剂盒说明书制备标本及染色,ELITE 流式细胞仪(Coulter 公司)检测。结果判断:Annexin V 阳性、PI 阴性为凋亡细胞(右下象限),Annexin V 阳性、PI 阳性为坏死细胞(右上象限),Annexin V 和 PI 双阴性为正常活细胞(左下象限)。

1.2.5 DNA 琼脂糖凝胶电泳观察 PBMCs 凋亡:取细胞悬液 1 ml,离心去上清液,加入 100 μ l 枸橼酸钠缓冲液,混悬 20 s,加入 50 μ l 含 7.5 mol/L 醋酸氨和 0.8 g/L 糖原的水溶液,混匀,加入体积分数为 100% 的乙醇,40 $^{\circ}$ C 过夜;用 75% 乙醇洗涤沉淀物 2 次,加 20 μ l 含 100 mg/L RNA 酶的 TE 缓冲液[1 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA), 10 mmol/L Tris-盐酸碱],37 $^{\circ}$ C 30 min,加入 10 μ l 甘油和少量溴酚蓝,直接点样,25 mV 电泳过夜;凝胶成像和化学发光图像分析系统下观察结果。

1.2.6 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法检

测 PBMCs Bcl-2 和 p53 的 mRNA 表达:RT-PCR 具体实验步骤按照试剂盒说明书进行。Bcl-2、p53、内参照 β -肌动蛋白(β -actin)基因引物序列根据 Primer 5.0 软件设计。Bcl-2 上游引物:5'-CTC-GTCGCTACCGTCGTGACTTCG-3';下游引物:5'-GACTGAGTACCT GAACCGGCATCTG-3'。p53 上游引物:5'-CACTCCAGCCACCTGAAGT-C-3';下游引物:5'-AA GCACCCAGGACTTCC-ATTTG-3'。 β -actin 上游引物:5'-GTGGACAT-CCGCAAAGAC-3';下游引物:5'-AGTTGCGT-TACACCCTTTC-3'。PCR 反应条件如下:Bcl-2:94 $^{\circ}$ C 预变性 10 min,93 $^{\circ}$ C 变性 45 s,56 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s,共 33 个循环;p53:94 $^{\circ}$ C 预变性 10 min,93 $^{\circ}$ C 变性 45 s,52 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,共 35 个循环。

1.3 统计学分析:数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间先行方差齐性检验,再用方差分析(ANOVA),两两比较采用 q 检验。使用 SPSS10.0 统计软件包进行分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 电镜及荧光显微镜观察:电镜下正常 PBMCs 细胞核均匀、疏松(彩色插页图 1A);MODS 患者凋亡 PBMCs 呈胞膜皱缩,核固缩、边集、碎裂,胞膜突起、凋亡小体形成(彩色插页图 1B)。荧光显微镜下正常的活 PBMCs 胞核荧光为黄绿色,胞核为椭圆形或类圆形,呈不均一的着色结构,细胞形态不一致,胞浆荧光为淡黄绿色(彩色插页图 2A);凋亡 PBMCs 胞核荧光为金黄色,核固缩为圆点、新月形、杆状,胞体略有缩小,胞浆荧光为淡黄绿色(彩色插页图 2B);未见呈红色荧光的坏死细胞。

2.2 DNA 琼脂糖凝胶电泳观察(图 3):MODS 组可以见到梯形电泳条带分布,条带间相差约 180~200 bp,而正常对照组没有出现梯形电泳条带。

2.3 两组 PBMCs 凋亡比较:流式细胞仪法检测结果显示,MODS 组和正常对照组 PBMCs 凋亡率分别为(25.4 \pm 9.2)%和(15.9 \pm 6.8)%($P < 0.01$,图 4A,4B),荧光显微镜检测结果显示,凋亡细胞数则分别为(1.040 \pm 0.096)和(0.235 \pm 0.028)个/HPF($P < 0.05$,彩色插页图 2A,2B)。

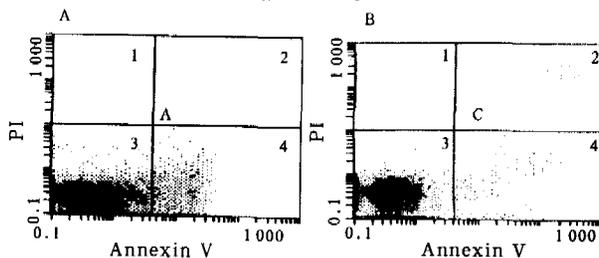
2.4 两组 PBMCs Bcl-2 和 p53 的 mRNA 表达量比较:MODS 组 PBMCs Bcl-2 mRNA 表达量为 0.11 \pm 0.09,明显低于正常对照组 0.19 \pm 0.06, ($P < 0.05$,图 5);MODS 组 p53 mRNA 表达量为 0.45 \pm 0.09,明显高于正常对照组 0.25 \pm 0.12,

($P < 0.05$, 图 6)。



图 3 DNA 琼脂糖凝胶电泳观察 PBMCs 凋亡情况

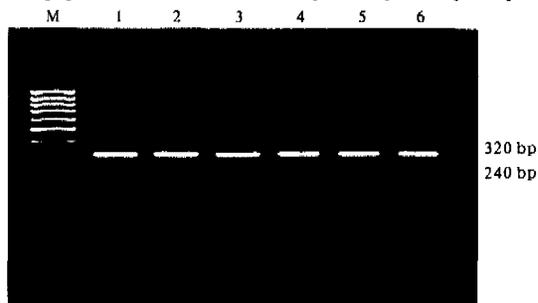
Figure 3 Apoptosis of PBMCs detected by DNA agarose gel electrophoresis



A 为 MODS 组; B 为正常对照组

图 4 流式细胞仪检测 PBMCs 凋亡情况

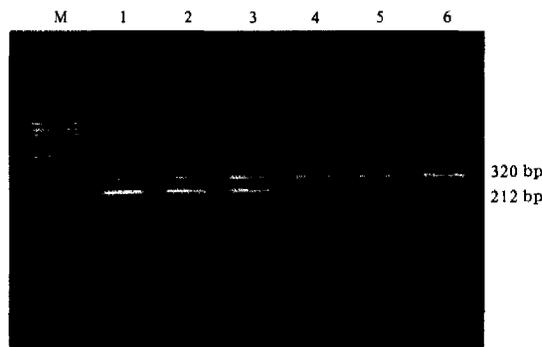
Figure 4 Apoptosis of PBMCs detected by flow cytometry assay



M 为 Marker, 100 bp; 1~3 为 MODS 组; 4~6 为正常对照组

图 5 RT-PCR 检测 PBMCs Bcl-2 mRNA 表达

Figure 5 Expression of Bcl-2 mRNA in PBMCs detected by RT-PCR



M 为 Marker, 100 bp; 1~3 为 MODS 组; 4~6 为正常对照组

图 6 RT-PCR 检测 PBMCs p53 mRNA 表达

Figure 6 Expression of p53 mRNA in PBMCs detected by RT-PCR

3 讨论

多器官功能衰竭(MOF)是临床常见的急危重症,也是重症监护室(ICU)患者的主要死亡原因之一,其病理生理和发生、发展过程极其复杂^[2-4]。Hotchkiss 等^[5-8]在系列的动物实验和临床研究中证实,MODS 中多个器官组织细胞凋亡存在异常,并进一步研究了凋亡调控基因的表达及其意义。

本研究中分别采用电子显微镜、荧光显微镜、流式细胞仪和 DNA 琼脂糖凝胶电泳法检测了 MODS 患者 PBMCs 的凋亡情况。结果发现,MODS 组患者 PBMCs 存在凋亡异常,其凋亡率明显高于正常对照组,提示 MODS 患者 PBMCs 凋亡增加,与文献报道一致^[6-9]。Adrie 等^[7]报道,在伴或不伴休克的脓毒症患者中,PBMCs 凋亡率在发病 72 h 内即明显增高,并同时测定了代表细胞不可逆凋亡的线粒体膜电位电势降低的百分率,发现死亡患者明显高于存活者。Le 等^[8]采用流式细胞仪检测 PBMCs 的凋亡,结果发现,在发病第 1 日,48 例脓毒症患者 PBMCs 凋亡率为(16.5±3.5)%,明显高于无脓毒症的对照组(3.0±0.5)%;在病程的第 6 日,25 例没有发展为休克患者的 CD4⁺和 CD8⁺淋巴细胞计数均恢复正常,而发展为感染性休克的 23 例患者仅 CD4⁺淋巴细胞计数恢复正常,提示感染性休克早期外周血淋巴细胞凋亡迅速增加,可导致淋巴细胞持续减少。本研究中发现,MODS 组 PBMCs 的 Bcl-2 mRNA 表达明显低于正常,p53 mRNA 表达明显高于正常,提示 MODS 的患者 PBMCs 抗凋亡基因 Bcl-2 和促凋亡基因 p53 表达均异常,与文献报道一致。Hotchkiss 等^[10,11]在系列研究中发现,MODS 中多种细胞 Bcl-2 表达下调,p53 表达上调,细胞凋亡增加;Bcl-2 转基因鼠的 T 细胞高表达 Bcl-2,可使 T 细胞免受脓毒症诱导的凋亡,Bcl-2 转基因鼠生存率明显高于野生鼠;在 p53 基因敲除鼠脓毒症模型中,胸腺细胞凋亡明显低于野生鼠。目前研究表明,Bcl-2 和 p53 是调控细胞凋亡的两个重要基因^[10,12,13],而在 MODS 发生、发展中,缺血/再灌注损伤、内毒素、活性氧等氧自由基、热休克蛋白等可诱导 Bcl-2 和 p53 表达异常。

综上,MODS 患者 PBMCs Bcl-2 和 p53 的基因表达异常,且可能与 PBMCs 凋亡异常有关,但确切机制及其与临床和预后的关系有待深入研究。

参考文献:

1 王今达,王宝恩.多脏器功能失常综合征(MODS)病情分期诊断及严重程度评分标准[J].中国危重病急救医学,1995,7:346-347.

- 2 Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer L L. Sepsis syndromes: understanding the role of innate and acquired immunity [J]. Shock, 2001, 16: 83-96.
- 3 石富胜, 鲁刚英, 狄桂萍, 等. 细胞凋亡在烫伤鼠肺组织损伤中的作用及其机制的实验研究 [J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14: 78-82.
- 4 Bone R C. Immunological dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS) [J]. Ann Intern Med, 1996, 125: 680.
- 5 Hotchkiss R S, Tinsley K W, Swanson P E, et al. Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4⁺ T lymphocytes in humans [J]. J Immunol, 2001, 166: 6952-6963.
- 6 Papatheanassoglou E D, Movnihan J A, Dafni O, et al. Association of proinflammatory molecules with apoptotic markers and survival in critically ill multiple organ dysfunction patients [J]. Biol Res Nurs, 2003, 5: 129-141.
- 7 Adrie C, Bachelet M, Vayssier-Taussat M, et al. Mitochondrial membrane potential and apoptosis peripheral blood monocytes in severe human sepsis [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 164: 389-395.
- 8 Le T Y, Pangault C, Gacouin A, et al. Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome [J]. Shock, 2002, 18: 487-494.
- 9 Joshi V D, Kalvakolanu D V, Cross A S. Simultaneous activation of apoptosis and inflammation in pathogenesis of septic shock: a hypothesis [J]. FEBS Lett, 2003, 555: 180-184.
- 10 Hotchkiss R S, Swanson P E, Knudson C M, et al. Overexpression of Bcl-2 in transgenic mice decreases apoptosis and improves survival in sepsis [J]. J Immunol, 1999, 162: 4148-4156.
- 11 Hotchkiss R S, Tinsley K W, Jia Jihui, et al. p53-dependent and -independent pathways of apoptotic cell death in sepsis [J]. J Immunol, 2000, 164: 3675-3680.
- 12 Macip S, Igarashi M, Berggren P, et al. Influence of induced reactive oxygen species in p53-mediated cell fate decisions [J]. Mol Cell Biol, 2003, 23: 8576-8585.
- 13 崔玉芳, 丁彦青, 张莹, 等. 致死剂量 γ 射线照射小鼠脾淋巴细胞凋亡特征及与 Bax 和 Bcl-X_i 表达的关系 [J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17: 109-112.

(收稿日期: 2005-05-09 修回日期: 2005-11-28)

(本文编辑: 郭方)

• 消息 •

第 13 届中国科技论文统计结果

2005 年 12 月 6 日, 中国科技信息研究所在北京国际会议中心公布了 2004 年度中国科技论文统计与分析结果, 其中医药学中影响因子较高的前 3 种期刊(根据 STPCD2004 年统计)分别如下。

2004 年度各医药学类期刊影响因子较高的前 3 种期刊

学科	排序	期刊	影响因子	学科	排序	期刊	影响因子
预防医学与卫生学类	1	中华结核和呼吸杂志	2.134	临床医学类	1	中华创伤骨科杂志	1.563
	2	中华传染病杂志	1.190		2	中华医学感染学杂志	1.410
	3	中华流行病学杂志	0.998		3	中华检验医学杂志	1.215
基础医学、医学综合类	1	中华医学管理杂志	1.289	保健医学类	1	中国康复医学杂志	0.704
	2	中华病理学杂志	1.084		2	中华物理医学与康复杂志	0.674
	3	中国危重病急救医学	1.080		3	中国运动医学杂志	0.409
医科大学学报类	1	第一军医大学学报	0.869	妇产科学、儿科学类	1	中华儿科杂志	1.310
	2	北京大学学报医学版	0.634		2	中华妇产科杂志	1.237
	3	中国医学科学院学报	0.535		3	中国儿童保健杂志	0.715
药理学类	1	中国药理学报	0.912	神经病学、精神病学类	1	中华神经科杂志	1.152
	2	中国新药与临床杂志	0.806		2	中华神经外科疾病研究杂志	1.011
	3	药物不良反应杂志	0.727		3	中华精神科杂志	0.985
口腔医学类	1	中华口腔医学杂志	0.771	内科学类	1	WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY	2.654
	2	口腔医学	0.555		2	世界华人消化杂志	1.769
	3	口腔颌面修复学杂志	0.528		3	中华消化杂志	1.315
外科学类	1	中华烧伤杂志	1.250	眼科学、耳鼻咽喉科学类	1	中华耳鼻咽喉科杂志	0.996
	2	中华骨科杂志	1.165		2	中华眼科杂志	0.877
	3	中国实用外科杂志	0.975		3	眼外伤职业眼病杂志	0.451
肿瘤学类	1	中华肿瘤杂志	1.079	中医学与中药学类	1	中西医结合学报	0.866
	2	中华放射肿瘤学杂志	0.661		2	中国中西医结合杂志	0.708
	3	癌症	0.598		3	中国中西医结合急救杂志	0.705
军事医学与特种医学类	1	中华放射学杂志	1.290	护理学类	1	中华护理杂志	1.494
	2	中华超声影像学杂志	0.712		2	中国实用护理杂志	1.147
	3	中国内镜杂志	0.614		3	解放军护理杂志	0.655

脓毒症早期大鼠肾脏细胞凋亡及炎症细胞因子的变化

(正文见89页)

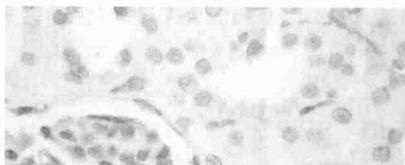


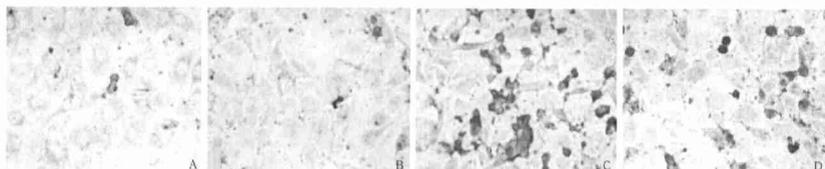
图3 致伤组伤后3 h凋亡细胞 (TUNEL, ×400)
Figure 3 Apoptotic cell in injury group
3 hours after injury (TUNEL, ×400)



图4 致伤组伤后48 h肾组织病理学变化 (HE, ×100)
Figure 4 Pathological change of renal tissue in injury group
48 hours after injury (HE, ×100)

八肽缩胆囊素对脂多糖诱导血管内皮细胞诱生型一氧化氮合酶表达变化的抑制作用

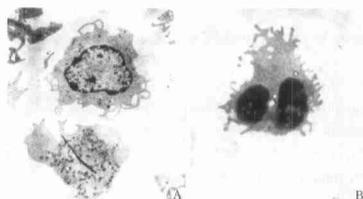
(正文见96页)



A: 对照组, B: CCK-8组, C: LPS组, D: LPS+CCK-8组
图6 免疫细胞化学法检测iNOS蛋白表达 (DAB, ×200)
Figure 6 Expression of iNOS detected by immunocytochemistry (DAB, ×200)

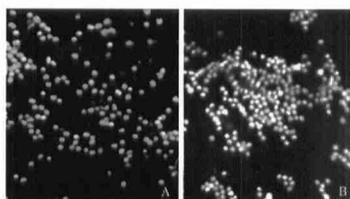
多器官功能障碍综合征患者外周血单个核细胞凋亡的研究

(正文见101页)



A: 正常PBMCs(×4000), B: 凋亡PBMCs(×1000)

图1 电镜下PBMCs (醋酸铀-枸橼酸铅)
Figure 1 PBMCs under electron microscope
(uranylacetate and lead citrate double staining)



A: 正常PBMCs, B: 凋亡PBMCs

图2 荧光显微镜下PBMCs (AO-EB, ×400)
Figure 2 PBMCs under fluorescence microscope
(AO-EB, ×400)

己酮可可碱对内毒素诱导大鼠心肌细胞细胞间黏附分子-1表达的影响及其机制

(正文见109页)



图4 空白对照组NF-κB p65表达 (DAB, ×200)
Figure 4 Expression of NF-κB p65 in myocytes in black control group (DAB, ×200)

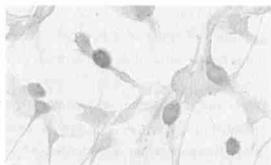


图5 100 μg/L LPS刺激1 h心肌细胞NF-κB p65表达 (DAB, ×200)
Figure 5 Expression of NF-κB p65 in myocytes at 1 hour induced by 100 μg/L of LPS (DAB, ×200)



图6 100 μg/L LPS+PTX 200 mg/L共同作用1 h心肌细胞NF-κB p65表达 (DAB, ×200)
Figure 6 Expression of NF-κB p65 in myocytes at 1 hour induced by 100 μg/L LPS+PTX 200 mg/L (DAB, ×200)