

脓毒症早期大鼠肾脏细胞凋亡及炎症细胞因子的变化

张 彧 任延波 蒋 丽

【摘要】 目的 研究脓毒症时肾脏组织细胞凋亡变化与炎症细胞因子的关系。方法 采用盲肠结扎穿孔术(CLP)建立 SD 大鼠脓毒症模型。分别取肾组织,通过组织裂解液,制备组织匀浆,测定匀浆上清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)含量;采用钙结合蛋白 V/碘化丙啶(Annexin V/PI)双染色法和流式细胞仪测定组织凋亡细胞,采用原位末端缺刻标记技术(TUNEL)和免疫组化分析细胞凋亡情况。结果 在脓毒症早期,肾组织匀浆中 TNF- α 、MCP-1 含量均明显增高,肾组织细胞凋亡数量增加以致伤后 3 h 为最高,6 h 后逐渐下降,差异均有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 TNF- α 、MCP-1 是脓毒症早期激活的细胞因子,脓毒症早期肾组织细胞凋亡数量增加与细胞因子大量释放有关。

【关键词】 脓毒症; 细胞凋亡; 肿瘤坏死因子- α ; 单核细胞趋化蛋白-1

Changes in renal cell apoptosis and inflammatory cytokines in early stage of sepsis in rats ZHANG Yu, REN Yan-bo, JIANG Li. Department of Emergency, First Hospital, Dalian Medical College, Dalian 116011, Liaoning, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the relationship between changes in renal cell apoptosis and inflammatory cytokines in sepsis rats. **Methods** Sepsis was produced in rats by cecal ligation and puncture. Changes in tumor necrosis factor- α (TNF- α) and monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) levels in renal tissues were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), respectively. Meanwhile, apoptosis rate was also assessed by Annexin V/PI staining and flow cytometry and terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP biotin nick end labeling (TUNEL) methods. **Results** TNF- α and MCP-1 levels in renal tissues were significantly increased in rats with sepsis in the early stage. Apoptosis rate of renal cells increased and reached the highest level at 3 hours after sepsis was established and decreased after 6 hours, and the differences were significant ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** TNF- α and MCP-1 are cytokines which are activated in early stage of sepsis. The increase in renal cell apoptosis in the early stage of sepsis is related with the release of cytokines.

【Key words】 sepsis; apoptosis; tumor necrosis factor- α ; monocyte chemotactic protein-1

脓毒症是感染因素所致的全身炎症反应综合征(SIRS)。在 SIRS 以及继发组织损伤时,机体释放一些不能控制的细胞因子进入循环,引起血流动力学不稳定、组织广泛损伤,导致多器官功能障碍综合征(MODS)。MODS 是重症监护室(ICU)患者中最常见的死亡原因之一。MODS 中出现 3 个脏器功能衰竭时,只要不伴肾功能衰竭,患者就能生存;如果同时存在急性肾功能衰竭(ARF),患者病死率可达 88%。可见及时诊断与防治 ARF 对防治 MODS 的发生、降低病死率是十分重要的。参与调节细胞因子释放及促炎症因子和抗炎因子的平衡,可能对炎症反应的严重性起决定性作用。细胞凋亡已被证实许多生物过程中起重要的调节作用,包括炎症反应;内毒素可诱发炎症介质释放及建立级联反应,诱导细胞凋亡,细胞凋亡反过来又促进炎症反应。因

此,探讨 ARF 发病机制,以寻求有效的防治措施尤为重要。本实验中以大鼠脓毒症时肾脏组织实验模型为基础,探讨细胞凋亡在 MODS 时肾脏早期改变中的意义。

1 材料与方法

1.1 实验动物和主要试剂:健康雄性 SD 大鼠,体重 180~230 g(由大连医科大学动物中心提供);原位末端缺刻标记技术(TUNEL)细胞凋亡试剂盒购自德国 Boehringer Mannheim 公司。

1.2 大鼠分组与模型制备:SD 大鼠 48 只,按随机数字表法分成 12 组,每组 4 只。其中 6 个组为致伤组,又分为致伤后 1、3、6、12、24 和 48 h 亚组;另外 6 个组为对照组,同样时间分组。两组大鼠术前 12 h 禁食、水,腹部局部脱毛,腹腔注射氯胺酮 0.32 ml (80 mg/kg)麻醉。致伤组大鼠采用盲肠结扎穿孔术(CLP)制模。腹正中切口,开腹将盲肠取出,在距盲端 1 cm 处结扎,用 12 号针头贯穿,然后将盲肠移入腹腔,缝合切口,编号(使用两种染料,一种编个位,一种编十位),置入笼内自由活动,不限饮食,每隔

基金项目:辽宁省教育厅科研基金资助项目(2004D124)

作者单位:116011 大连医科大学附属第一医院急诊科

作者简介:张彧(1958-),女(汉族),山东人,教授,硕士研究生导师,主任医师,中国中西医结合学会急救分会委员。

3~4 h 观察 1 次; 6 个对照组以同样方法开腹, 但不结扎、不穿孔, 同时间分组、编号。

1.3 组织肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)测定:依照 Tulzo 等^[1]方法收集组织匀浆上清, -20℃ 保存, 酶联免疫吸附法(ELISA)测定 TNF- α 和 MCP-1 含量, 测定按照试剂盒说明进行。

1.4 凋亡细胞制备:根据酶溶解组织提取细胞的方法取材。组织用磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗干净后, 浸泡在含 PBS 的平皿中, 剪碎, 放入试管中, 加入 3 ml PBS 及质量分数为 0.1% 的胶原酶, 37℃ 温箱消化 48 h, 1 000 r/min 离心 10~15 min, 去上清, PBS 漂洗、离心、去上清, 并重复 2~3 次。计数活细胞及细胞数为 $10^4 \sim 10^6 / \text{mm}^3$ 。采用钙结合蛋白 V/碘化丙啶(Annexin V/PI)双染色法和流式细胞仪测定组织凋亡细胞。

1.5 TUNEL 检测:大鼠肾脏经体积分数为 10% 的甲醛固定, 常规石蜡包埋, 经肾门纵向 4 μm 连续切片 6 张, 3 张行苏木素-伊红(HE)染色, 余 3 张行凋亡检测(TUNEL 法)。切片脱蜡, 梯度乙醇水化。湿盒内(37℃)经 25 mg/L 蛋白酶 K 消化 20 min, PBS 洗 5 min \times 2 次; 加体积分数为 0.3% 的 H_2O_2 -甲醇液以阻断内源性过氧化物酶, 30 min, PBS 洗 5 min \times 3 次; 加入 TUNEL 反应液, 湿盒内(37℃)孵育 1 h, PBS 洗 5 min \times 2 次; 加过氧化物酶连接的抗荧光素抗体, 湿盒内(37℃)孵育 30 min, PBS 洗 5 min \times 3 次; 3, 3'-二氨基联苯胺(DAB)显色, 苏木素复染, 树胶封片, 显微镜下观察。

2 结果

2.1 肾组织细胞凋亡、TNF- α 和 MCP-1 的变化

2.1.1 肾组织匀浆细胞凋亡的变化:CLP 致伤后 1~3 h 凋亡细胞明显增多, 于致伤后 3 h 达高峰, 与对照组比较差异均有显著性(表 1)。流式细胞仪测定凋亡细胞所占构成比见图 1 和图 2。

2.1.2 肾组织匀浆 TNF- α 水平变化(表 1):CLP 致伤后 1~48 h 肾组织匀浆 TNF- α 水平明显升高, 于致伤后 3 h 达高峰, 致伤各时间点与对照组比较差异均有显著性(P 均 < 0.01)。

2.1.3 肾组织匀浆 MCP-1 水平变化(表 1):CLP 致伤后 1~48 h 肾组织匀浆 MCP-1 水平明显升高, 于致伤后 3 h 达高峰, 致伤各时间点与对照组比较差异均有显著性(P 均 < 0.01)。

2.2 免疫组化 TUNEL 染色结果(彩色插页图 3):凋亡细胞 DNA 链在核酸内切酶的作用下发生断

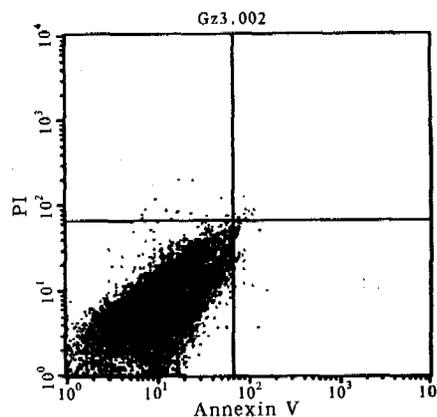
裂, 产生羟基末端, 通过 TUNEL 标记。致伤组在 3 h 即可见到部分细胞呈阳性染色, 阳性细胞染成棕黄色, 表明出现了凋亡细胞。

表 1 脓毒症模型大鼠 TNF- α 、MCP-1 和细胞凋亡结果($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 1 Changes in TNF- α , MCP-1 levels and cell apoptois in septic rats($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	细胞凋亡(%)	TNF- α (ng/L)	MCP-1(ng/L)
对照组	0.19 \pm 0.21	79.25 \pm 23.75	606.00 \pm 35.00
致伤 1 h 组	6.32 \pm 0.48 Δ	1 021.00 \pm 43.36 Δ	2 976.00 \pm 39.00 Δ
致伤 3 h 组	12.68 \pm 0.32 Δ	1 629.00 \pm 46.32 Δ	3 562.00 \pm 53.00 Δ
致伤 6 h 组	3.45 \pm 0.26 Δ	983.00 \pm 38.72 Δ	2 734.00 \pm 48.00 Δ
致伤 12 h 组	1.26 \pm 0.24 Δ	920.00 \pm 42.29 Δ	2 648.00 \pm 32.00 Δ
致伤 24 h 组	1.68 \pm 0.43 Δ	832.00 \pm 38.65 Δ	2 372.00 \pm 42.00 Δ
致伤 48 h 组	1.06 \pm 0.23 Δ	901.00 \pm 37.86 Δ	2 764.00 \pm 41.00 Δ

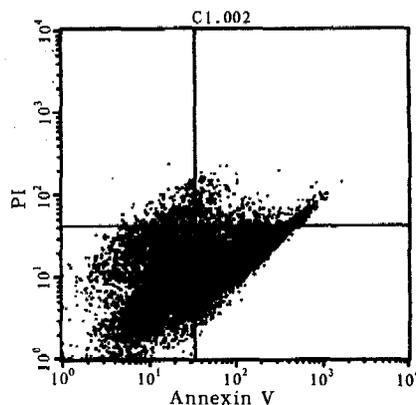
注:与对照组比较; $\Delta P < 0.01$



注:右上为凋亡 0.39%

图 1 对照组 3 h 细胞凋亡

Figure 1 Apoptosis in 3 hours of control groups (0.39%)



注:右上为凋亡 39%

图 2 致伤组 3 h 细胞凋亡

Figure 2 Apoptosis in 3 hours of injury groups (39%)

2.3 病理学变化(彩色插页图 4):光镜下致伤组肾小管出现浊肿、变性, 部分出现坏死, 以 48 h 最明显; 对照组无明显改变。

3 讨论

脓毒症的发展与 SIRS 宿主对突发刺激的反应程度有关,是宿主对感染刺激过度反应的结果,尽管体内防御机制对机体是有益的,能中和侵入的微生物,清除损伤的细胞和修复破坏组织,但过度的活化可能是有害的^[2,3]。在此过程中,细胞因子起信息分子作用,发出不同的细胞反应信号,引起细胞和体液反应。肾脏是 SIRS 和脓毒症休克的靶器官,内皮细胞损伤的结果多累及心、肺和肾,特点是生成一些过量的促炎症体液介质。

CLP 后由于组织坏死、肠道组织通透性增加、细菌移位,形成脓毒症,严重者导致 MODS。致伤组大鼠致伤后肾组织匀浆液 TNF- α 、MCP-1 水平均显著升高,在致伤后 3 h 达高峰。TNF 已被认为是机体系统炎症发病机制中的前炎症细胞因子^[4]。TNF- α 主要来源于单核/巨噬细胞等,主要通过诱导其他细胞因子的产生和释放,如白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-6 等造成机体损伤的同时,再激活炎症效应细胞,释放更多的炎症因子,使炎症信号进一步放大和加强,产生“级联放大”作用。

MCP-1 是几种类型细胞(如单核细胞、肾小管上皮细胞)分泌的一种强效化学激活合成物,能刺激核转录因子- κ B(NF- κ B)的活性^[5,6]。NF- κ B 是急性炎症反应的中枢环节,通过调节炎症因子的基因表达,控制 SIRS 的发展。

细胞凋亡已被证实在许多生物过程中起重要的调节作用,包括炎症反应。有研究显示,内毒素、烧伤、缺血等均可导致相关脏器的细胞凋亡^[7]。本研究中通过 TUNEL 染色、流式细胞仪观察细胞凋亡客观指标,发现在致伤后 3 h 肾组织细胞凋亡已显著高于对照组,随着损伤程度的加重,细胞凋亡呈先增加后减少的趋势。正常肾组织细胞很少发生细胞凋亡,本研究显示脓毒症早期肾组织发生细胞凋亡的总体水平不高,与 TNF- α 和 MCP-1 的值同时达到高峰,表明 TNF- α 是介导细胞凋亡的重要介质^[8]。有实验显示, TNF- α 诱导内毒素所致肝细胞发生凋亡,细胞凋亡反过来又促进炎症反应^[9]。随着 ATP 大量耗竭,导致细胞膜上的“死亡通道”开放,引起细胞坏死,坏死最常见于近端肾小管。内毒素可诱发炎症介质释放及建立级联反应,同时肾小管上皮细胞可产生致炎因子,包括 TNF- α 、IL-6、转化生长因子- β (TGF- β)和趋化因子等。

如果开始感染严重,脓毒症将直接导致 MODS 的发生,严重的炎症反应伴随器官细胞坏死,但发生

细胞凋亡时,潜在炎症反应的危害是有限的。因此脓毒症时,凋亡有减轻炎症的作用^[5]。在严重脓毒症中,呈瀑布样释放的前炎症因子和抗炎症细胞因子也调节细胞的死亡程序,因此,在伴随系统性器官功能障碍的脓毒症患者,组织中的凋亡细胞比循环中的凋亡细胞要重要的多。凋亡可能通过清除产生前炎症因子的单核细胞而对机体产生有益的作用,也可能使宿主的防御能力下降而起坏作用,如肾小管细胞凋亡直接导致通透性增加,局部淋巴细胞凋亡使抵抗力下降而易发生感染。

本研究显示,脓毒症早期,肾小管细胞凋亡的增加与炎症因子 TNF- α 和 MCP-1 增加密切相关。有资料显示,应用 TNF- α 抗体可明显减少肠集合淋巴结中淋巴细胞凋亡^[10,11]。早期肾小管细胞结构重建是以凋亡的方式参与;而晚期细胞凋亡数量减少,使其不能参加结构重建,致坏死细胞增多,进一步加重了肾功能的损害。表明肾组织细胞凋亡数量与炎症因子 TNF- α 和 MCP-1 的表达对肾功能衰竭早期诊断提供预警指标,并对判断预后提供依据。

参考文献:

- 1 Tulzo Y L, Shenkar R, Kancko D, et al. Hemorrhage increases cytokine suppression in lung mononuclear cells in mice [J]. J Clin Invest, 1997, 99: 1516-1624.
- 2 姚咏明, 盛志勇, 林洪远, 等. 脓毒症定义及诊断的新认识 [J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16: 321-324.
- 3 Snowden C, Kirkman E. The pathophysiology of sepsis [J]. CEACCP, 2002, 2: 11-14.
- 4 李志军. 菌毒炎并治与多器官功能障碍综合征 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2004, 11: 381-383.
- 5 Thibeault I, Laflamme N, Rivest S. Regulation of the gene encoding the monocyte chemoattractant protein 1 in the mouse and rat brain in response to circulating LPS and proinflammatory cytokines [J]. J Comp Neurol, 2001, 434: 461-477.
- 6 Kanno Y, Okada H, Yamaji Y, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitors slow renal decline in IgA nephropathy, independent of tubulointerstitial fibrosis at presentation [J]. QJM, 2005, 98: 199-203.
- 7 董月青, 黄军华, 姚咏明. 脓毒症中 T 淋巴细胞凋亡及其调控研究进展 [J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16: 381-384.
- 8 王颖, 张淑文, 王宝恩. 细胞凋亡在大鼠急性肺损伤发生机制中的意义 [J]. 中国危重病急救医学, 2001, 13: 90-94.
- 9 陈绪军. 肝细胞损伤, 细胞凋亡及肝细胞保护 [J]. 国外医学外科学分册, 2000, 27: 21-24.
- 10 Woodside K J, Spies M, Wu Xiaowu, et al. Decreased lymphocyte apoptosis by anti-tumor necrosis factor antibody in peyer's patches after severe burn [J]. Shock, 2003, 20: 70-73.
- 11 唐道林, 肖献忠. 高迁移率族蛋白-1 与脓毒症 [J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16: 113-116.

(收稿日期: 2005-05-12 修回日期: 2006-01-20)

(本文编辑: 李银平)

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)

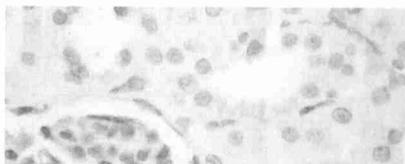


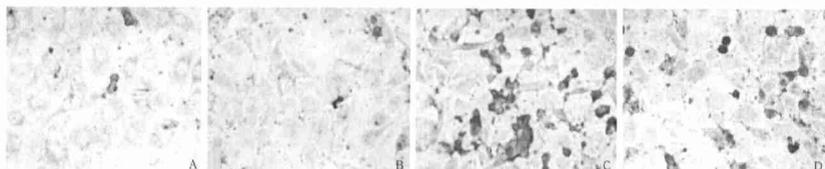
图3 致伤组伤后3 h凋亡细胞 (TUNEL, ×400)
Figure 3 Apoptotic cell in injury group
3 hours after injury (TUNEL, ×400)



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

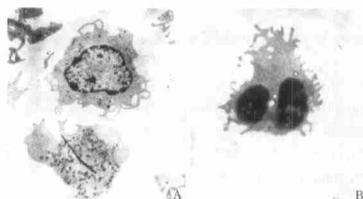
(正文见96页)



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)

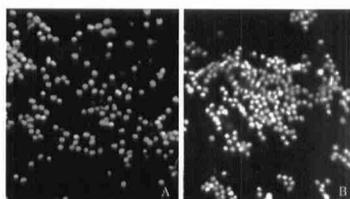
多器官功能障碍综合征患者外周血单个核细胞凋亡的研究

(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)

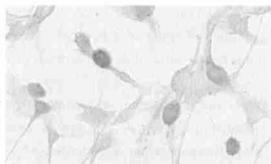


图5 100 μg/L LPS刺激1 h心肌细胞NF-κB p65表达 (DAB, ×200)
Figure 5 Expression of NF-κB p65 in myocytes at 1 hour induced by 100 μg/L of LPS (DAB, ×200)



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)