

## 中性粒细胞凋亡调控基因表达异常在全身炎症反应综合征中的作用

尚东 齐清会 王宝枝 陈海龙 毕伟 关凤林

**【摘要】** 目的 观察全身炎症反应综合征(SIRS)时中性粒细胞(PMN)凋亡的异常变化及其凋亡调控基因的表达情况,评价其临床意义。方法 8例SIRS患者(均为急性胰腺炎患者)作为SIRS组,6名健康献血者作为正常对照组。分别观察两组外周血PMN凋亡率、凋亡调控基因Fas/FasL和凋亡信号转导分子天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3(caspase-3)及血清白细胞介素-6(IL-6)、IL-8的水平。结果 SIRS组外周血血清IL-6和IL-8水平均明显高于正常对照组( $P < 0.01$ )。SIRS组患者外周血PMN细胞凋亡率较正常对照组明显减少( $P < 0.01$ );两组PMN在体外培养24h后,用蛋白质免疫印迹法(Western blotting)没有检测到FasL表达;SIRS组患者外周血PMN的Fas、caspase-3表达水平与正常对照组比较明显降低( $P < 0.01$ )。结论 SIRS患者存在PMN的凋亡异常和Fas、caspase-3表达水平下调,PMN凋亡延迟在SIRS的发生发展中有着重要意义。

**【关键词】** 全身炎症反应综合征; 中性粒细胞; 细胞凋亡; 基因表达

**Role of polymorphonuclear neutrophil apoptosis and expression of Fas and caspase - 3 in the systemic inflammatory response syndrome** SHANG Dong, QI Qing-hui, WANG Bao-zhi, CHEN Hai-long, BI Wei, GUAN Feng-lin. Department of General Surgery, First Teaching Hospital, Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning, China

**【Abstract】** **Objective** To study the role of the polymorphonuclear neutrophil (PMN) apoptosis and expression of Fas and caspase - 3 in the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). **Methods** Eight acute pancreatitis patients with SIRS, 6 healthy control subjects were enrolled to study apoptosis of PMN in peripheral blood samples, expression of Fas/Fas ligand (FasL) and caspase - 3 in the PMN, the levels of serum interleukin - 6 (IL - 6) and IL - 8 were observed. **Results** Spontaneous apoptosis was significantly delayed in PMN from the SIRS patients with higher serum IL - 6 and IL - 8 levels compared with controls (both  $P < 0.01$ ). PMN apoptosis rate in peripheral blood of patients with SIRS was lowered than that of controls ( $P < 0.01$ ). The expressions of Fas and caspase - 3 in the peripheral circulating PMN were higher in the controls than those in the SIRS patients (both  $P < 0.01$ ). Serum FasL expression was not found by Western blotting 24 hours after culture of PMN in vitro. **Conclusion** Peripheral circulating PMN from acute pancreatitis patients with SIRS show delayed apoptosis, decreased expressions of Fas and caspase - 3, and prolonged PMN survival may contribute to the development of systemic inflammatory injury characteristic of SIRS.

**【Key words】** systemic inflammatory response syndrome; polymorphonuclear neutrophil; apoptosis; genes expression

全身炎症反应综合征(SIRS)是多器官功能障碍综合征(MODS)和多器官功能衰竭(MOF)的前期表现<sup>[1]</sup>。中性粒细胞(PMN)是炎症反应的重要标志,在其发生发展和转归中发挥关键作用。如果PMN凋亡延迟,则引起“呼吸爆发”,造成恶性循环,从而加重SIRS<sup>[2]</sup>。目前,国外关于PMN凋亡异

常情况与SIRS病情发展关系的研究比较多<sup>[3,4]</sup>,但是,国内尚无相关的报道。我们研究了急性胰腺炎所致SIRS患者的外周血PMN凋亡及凋亡调控基因Fas/FasL和凋亡信号转导分子天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3(caspase-3)的表达情况,探讨二者的相关性,以期提高对SIRS的认识,进一步深入研究SIRS的发生发展机制。

### 1 资料与方法

**1.1 病例选择:**2003年9月—2005年3月本院收治的8例(发病24h内入院)急性胰腺炎患者,均发生SIRS,其诊断根据1991年美国胸科医师协会/危重病医学会(ACCP/SCCM)联席会议和2001年“国际脓毒症定义”大会提出的SIRS标准<sup>[5,6]</sup>。

基金项目:辽宁省博士启动基金资助项目(2001102079)

作者单位:116011 辽宁,大连医科大学附属第一医院普外三科

作者简介:尚东(1971-),男(汉族),辽宁省辽阳人,医学博士,副教授,从事胰腺、胆道疾病及所致全身炎症反应综合征方面的研究,获省、部级科技进步一、二等奖4项,大连市十大科技英才获得者,辽宁省“百千万人才工程”百层次人选(Email: shangdong@dmu-1.com或s07780980@sina.com)。

1.2 主要检测试剂:末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记法 (TUNEL) 试剂盒由德国 Roche 公司提供。钙结合蛋白 V-异硫氰酸荧光素 (Annexin V-FITC) 试剂盒由深圳晶美生物工程有限公司提供。白细胞介素-6 (IL-6)、IL-8 酶联免疫吸附法 (ELISA) 试剂盒由美国 Genzyme 公司提供。所用抗体均为抗人单克隆抗体 (单抗), 最小测量值均为 12 ng/L; 兔抗人 Fas 抗体、兔抗人 Fas 配体 (FasL) 抗体、兔抗人 caspase-3 抗体、羊抗兔二抗、生物素标记的辣根过氧化物酶 (HRP)、3,3'-二氨基联苯胺 (DAB) 均为美国 Santa Cruze 公司产品。

1.3 研究方法:采患者入院当日外周静脉血 5 ml, 分别检测 PMN 凋亡及 IL-6、IL-8 水平。另选 6 名健康献血者的指标作为正常对照组。

1.3.1 PMN 分离与培养:采血后,立即用梯度离心法进行 PMN 分离与培养,用苔盼蓝排斥试验检测,PMN 存活率 >95%,纯度 >95%。在 37 °C、含体积分数 5% 的 CO<sub>2</sub> 饱和湿度条件下孵育 24 h,测定 PMN 凋亡情况。

1.3.2 流式细胞仪分析:Annexin V 阳性为凋亡细胞,碘化丙啶 (PI) 阳性为坏死细胞,Annexin V、PI 双阳性为凋亡晚期/坏死细胞。

1.3.3 凋亡调控基因 Fas/FasL 和凋亡信号转导分子 caspase-3 表达的检测:用蛋白质免疫印迹法 (Western blotting) 收集细胞,用冷磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗 2 次,加 1 ml 冰细胞裂解液 [三羟甲基氨基甲烷盐酸盐 (Tris-HCl) 20 mmol/L, 体积分数为 1% 的 Triton X-100 和 0.02% 的 NaN<sub>3</sub>, 苯甲基磺酰氟化物 (PMSF) 100 g/L, 150 mmol/L Na<sub>2</sub>Cl], 冰浴 15 min, 其间反复混匀多次,4 °C 12 000 r/min (离心半径为 5.8 cm) 离心 10 min, 吸取上清液,用考马斯亮蓝法 (Bradford 法) 测定蛋白浓度。细胞蛋白在 100 °C 下变性 3 min, 冰上冷却后加样,用质量分数为 5% 的聚丙烯酰胺浓缩胶和质量分数为 10% 的分离胶进行电泳 1 h。将胶和硝酸纤维素膜夹于滤纸间,放入装有转移缓冲液的电转移槽中,转移 100 min。硝酸纤维素膜加质量分数为 5% 的脱脂奶粉,37 °C 的湿盒中封闭 2 h; 加兔抗人 Fas、FasL、caspase-3 的一抗稀释液,置于 4 °C 冰箱中过夜,室温放置 30 min,用含吐温的三羟甲基氨基甲烷缓冲液 (TTBS) 洗膜 10 min × 3 次; 加羊抗兔二抗,37 °C 的湿盒中孵育 40 min, TTBS 洗膜 10 min × 3 次; 加生物素标记的 HRP, 在 37 °C 的湿盒中孵育 40 min, TTBS 洗膜 10 min × 3 次, DAB 显色。图像存入计

算机,以 Microsoft 公司的 Quanti Scan 软件进行灰度扫描,计算面积灰度值。

1.3.4 血清 IL-6、IL-8 水平的检测:采血后立即进行离心留取血清,采用 ELISA 进行检测。

1.4 统计学处理:数据采用均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,结果用 SPSS10.0 统计软件分析,进行 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 两组外周血清 IL-6 和 IL-8 水平的比较 (表 1); SIRS 组血清 IL-6、IL-8 水平较正常对照组均明显升高,差异均有显著性 ( $P$  均 < 0.01), 说明 SIRS 组患者存在“高细胞因子血症”。

表 1 两组血清 IL-6 和 IL-8 水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Comparison of serum IL-6 and IL-8 levels between two groups ( $\bar{x} \pm s$ ) ng/L

组别	例数 (例)	IL-6	IL-8
正常对照组	6	2.1 ± 1.3	12 ± 4
SIRS 组	8	8.2 ± 2.2 (6.014)*	38 ± 12 (5.056)*

注:与正常对照组比较: \*  $P < 0.01$ ; 括号内为 *t* 值

2.2 Western blotting 检测结果:两组外周血 PMN 凋亡调控基因 FasL 的表达均为阴性。

2.3 两组外周血 PMN 凋亡及凋亡调控基因 Fas 和 caspase-3 的比较 (表 2); SIRS 组 PMN 凋亡及凋亡调控基因 Fas 和 caspase-3 的表达水平均较正常对照组显著降低 ( $P$  均 < 0.01), 说明 SIRS 患者外周血 PMN 的凋亡明显比正常对照组延迟,可能与 Fas 和 caspase-3 的表达下调有关。

表 2 两组 PMN 凋亡率及 Fas 和 caspase-3 比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Comparison of apoptosis rate, Fas and caspase-3 levels of PMN between two groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数 (例)	PMN 凋亡率 (%)	面积灰度值	
			Fas	caspase-3
正常对照组	6	63 ± 10	259 ± 32	158 ± 24
SIRS 组	8	42 ± 8 (4.375)*	204 ± 28 (3.425)*	106 ± 26 (3.822)*

注:与正常对照组比较: \*  $P < 0.01$ ; 括号内为 *t* 值

## 3 讨论

凋亡与坏死是细胞死亡的两种方式。细胞凋亡指为维持内环境稳定,由基因控制的细胞自主、有序性的死亡,其与坏死有着本质的区别<sup>[7]</sup>。凋亡的细胞最后形成凋亡小体,凋亡小体被吞噬细胞或邻近其他细胞吞噬,不引起炎症反应。而细胞坏死是一种细胞被动死亡的过程,形态学表现为胞膜完整性受损,线粒体及其他细胞器肿胀、破坏,细胞骨架断裂,溶酶体崩解,其内容物释放,从而引起炎症反应。

PMN 在机体防御系统中的生理效应通过其增

殖和分泌功能进行调节,其数量和功能变化与 SIRS 的发生发展相关,PMN 不仅可以释放氧自由基、蛋白酶和炎症介质,还可以与刺激因素相互作用引起“瀑布反应”,诱发 SIRS<sup>[8]</sup>。正常生理情况下,循环中的 PMN 半衰期很短(约 6~10 h),当其进入炎症部位时,寿命将成倍延长。衰老的 PMN 在无细胞因子和促炎物质条件下发生自发凋亡,并被吞噬,以阻止由于 PMN 坏死而释放各种酶和毒性物质引起的组织损伤,而且巨噬细胞吞噬凋亡的 PMN 不会激活巨噬细胞释放炎症介质。因此,凋亡被认为是机体清除具有潜在损害活性的 PMN 有效的生理调节机制<sup>[2,9]</sup>。在急性炎症时,由于 PMN 从循环中向炎症部位迁移,组织中的 PMN 数量将大大增加,而且炎症介质作用使其凋亡减少,这就使 PMN 持续被激活,最终可引起 SIRS。

本研究结果发现,急性胰腺炎患者血清 IL-6、IL-8 水平较正常人明显升高,说明存在 SIRS,同时 SIRS 患者外周血 PMN 凋亡明显延迟,可能与大量的炎症介质作用使其凋亡减少有关。另外,凋亡延迟也使 PMN 数量增加,同时释放氧自由基、蛋白酶和炎症介质,引起“呼吸爆发”,产生级联反应,加重 SIRS 的严重程度,促进 SIRS 向 MODS 发展。

在生理条件下,PMN 以自分泌和旁分泌方式表达 Fas 和 FasL,调控细胞凋亡,保持自身数量稳定<sup>[10]</sup>。Hsieh 等<sup>[11]</sup>用流式细胞仪检测正常 PMN 的 Fas 和 FasL 动态表达,发现体外培养时 Fas 和 FasL 表达阳性率随时间逐渐降低,说明在 PMN 表面既表达 Fas 也表达 FasL,而且 FasL 要比 Fas 消失得快。本研究结果显示,体外培养 PMN 达 24 h 后,经 Western blotting 没有检测到 FasL 表达,提示可能与 FasL 消失有关。

到目前为止,已知 Fas 启动的细胞内信号需要通过蛋白酶途径。Caspase-3 被称为“死亡执行者”,正常时以无活性前体形式存在于细胞浆中,其激活是细胞凋亡的主要途径。激活的 caspase-3 通过蛋白水解作用来激活 DNA 酶(caspase activated DNAase, CAD),介导细胞染色体 DNA 碎裂和磷脂酰丝氨酸(phos-phatidylserine, PS)移向膜外,启动细胞凋亡,因此,细胞中 caspase-3 激活的减少就意味着将导致细胞凋亡延迟。研究表明,PMN 凋亡延迟与 FasL 和 caspase-3、caspase-6、caspase-7、caspase-8 的表达下调有关<sup>[11,12]</sup>。本研究结果也显示,SIRS 组 PMN 的 Fas 和 caspase-3 表达均显著低于正常对照组,提示 SIRS 患者 PMN 凋亡延迟与

Fas 和 caspase-3 的表达下调有关。Power 等<sup>[13]</sup>发现,细菌脂蛋白(BLP)通过抑制 caspase-3 活性来延迟 PMN 凋亡。另外,SIRS 时内毒素通过诱导产生凋亡抑制蛋白-2(cIAP-2)加速活化 caspase-3 的降解,从而延迟 PMN 凋亡<sup>[14]</sup>。因此,对 PMN 凋亡延迟机制进行深入研究并加以阐明,有利于揭示 SIRS 发生发展的机制,并为 SIRS 的治疗提供理论基础。通过诱导、加速 PMN 凋亡或给予一些相关的药物来特异性地增强吞噬细胞(如巨噬细胞等)对凋亡 PMN 的清除,从而达到治疗疾病的目的。

#### 参考文献:

- 1 Bone R C. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS[J]. Crit Care Med, 1996, 24(7): 1125-1128.
- 2 Chilvers E R, Cadwallader K A, Reed B J, et al. The function and fate of neutrophils at the inflamed site: prospects for therapeutic intervention[J]. J R Coll Physicians Lond, 2000, 34(1): 68-74.
- 3 Jimenez M E, Watson R W, Parodo J, et al. Dysregulated expression of neutrophil apoptosis in the systemic inflammatory response syndrome[J]. Arch Surg, 1997, 132(12): 1263-1269.
- 4 Diebel L N, Liberati D M, Taub J S, et al. Intestinal epithelial cells modulate PMN activation and apoptosis following bacterial and hypoxic challenges[J]. J Trauma, 2005, 58(6): 1126-1133.
- 5 American college of chest physicians/society of critical care medicine consensus conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis [J]. Crit Care Med, 1992, 20(6): 864-874.
- 6 Levy M M, Fink M P, Marshall J C, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS international sepsis definitions conference[J]. Crit Care Med, 2003, 31(4): 1250-1256.
- 7 Vaux D L, Strasser A. The molecular biology of apoptosis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(6): 2239-2244.
- 8 张新日, 杜永成, 姜宏英, 等. 中性粒细胞活化在呼吸机所致肺损伤中的作用[J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17(6): 367-369.
- 9 隔建成, 周宝桐, 蒋礼先, 等. 创伤性脓毒症过程中外周血中性粒细胞凋亡的实验研究[J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17(9): 561-564.
- 10 Liles W C, Kiener P A, Ledbetter J A, et al. Differential expression of Fas(CD95) and Fas ligand on normal human phagocytes: implications for the regulation of apoptosis in neutrophils[J]. J Exp Med, 1996, 184(2): 429-440.
- 11 Hsieh S C, Huang M H, Tsai C Y, et al. The expression of genes modulating programmed cell death in normal human polymorphonuclear neutrophils [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 233(3): 700-706.
- 12 Le'Negrato G, Rostagno P, Auberger P, et al. Downregulation of caspases and Fas ligand expression, and increased life span of neutrophils after transmigration across intestinal epithelium[J]. Cell Death Differ, 2003, 10(2): 153-162.
- 13 Power C P, Wang J H, Manning B, et al. Bacterial lipoprotein delays apoptosis in human neutrophils through inhibition of caspase-3 activity; regulatory roles for CD14 and TLR-2 [J]. J Immunol, 2004, 173(8): 5229-5237.
- 14 Mica L, Harter L, Trentz O, et al. Endotoxin reduces CD95-induced neutrophil apoptosis by cIAP-2 mediated caspase-3 degradation[J]. J Am Coll Surg, 2004, 199(4): 595-602.

(收稿日期: 2006-09-06)

(本文编辑: 李银平)