

· 研究报告 ·

脓毒症大鼠胸腺细胞凋亡及线粒体的变化

肖莉 王志强

【关键词】 脓毒症； 胸腺细胞； 细胞凋亡

脓毒性休克是临床上常见的危重病,病死率居高不下。在其病理损伤中,细胞凋亡的作用日益受到重视。脓毒性休克可导致胸腺细胞发生大量病理性凋亡,这种病理改变可能与脓毒性休克时细胞免疫功能抑制有关。本实验通过盲肠结扎穿孔术(CLP)诱导的脓毒症动物模型,观察胸腺细胞的凋亡及其与细胞线粒体结构、功能变化的关系。

1 材料与与方法

1.1 实验材料:健康雄性 Wistar 大鼠,体重 180~200 g,由华中科技大学同济医学院动物中心提供,钙结合蛋白 V (Annexin V)及碘化丙啶(PI)双标试剂盒购自瑞士 Roche 公司,ATP 酶活性、组织超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)含量试剂盒购自南京建成生物研究所,罗丹明 123(Rhodamine123)为美国 Sigma 公司产品,其他试剂均为国产分析纯。EPICS 型流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司)。

1.2 动物模型制备与分组:参照文献[1]方法进行 CLP 诱导脓毒症动物模型的建立,按随机数字表法将动物分为两组($n=20$):CLP 组行 CLP;假手术组分离出盲肠后既不结扎也不穿孔,作为对照。两组分别于术后 12 h 和 24 h 断颈处死动物后行病理剖学检查,并留取内脏备用。

1.3 光镜和透射电镜下组织学观察:在进行 CLP 后不同时间点断颈处死动物,取胸腺。部分组织常规石蜡切片,苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察并拍照,部分组织常规行电镜制片,透射电镜下观察细胞线粒体形态学改变。

1.4 凋亡细胞百分率检测:在不同时间点处死各组动物后,常规消毒,迅速分离完整胸腺,无菌纱布拭净残血,制备胸腺细胞悬液,光镜下计数,调整细胞浓度至

作者单位:443002 湖北宜昌三峡大学医学院

作者简介:肖莉(1979-),女(汉族),湖北省人,硕士,讲师(xiaoli-cn@163.com)。

表 1 两组胸腺细胞凋亡及 DNA 断裂的情况($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数 (只)	细胞凋亡率(%)		DNA 断裂百分率(%)	
		12 h	24 h	12 h	24 h
假手术组	20	12.22±0.51	19.32±1.20	6.35±0.58	9.65±0.44
CLP 组	20	50.30±2.88*	57.26±2.24*	25.00±0.91*	31.57±1.51*

注:与假手术组比较;* $P<0.01$

($2\sim 5$) $\times 10^6$ /L。应用 Annexin V 及 PI 双标试剂盒检测,按说明书要求操作,检测 10 000 个细胞,计数位于凋亡区内的细胞数量,得到凋亡细胞的百分率。

1.5 DNA 断裂百分率检测:取 300 μ l 胸腺细胞悬液,与等量的低张细胞膜裂解缓冲液[含 10 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA),75 mmol/L NaCl,质量分数为 0.5% 的十二烷基硫酸钠(SDS),10 mmol/L Tris-HCl,pH 8.0]混匀,致细胞膜破裂(核膜未破),13 000 r/min (离心半径 25 cm)离心 10 min。将上清液倒入另一支试管中,按 Burton^[2]介绍的方法(二苯胺法)略加修改后测定,计算胸腺细胞基因组 DNA 断裂百分率。

DNA 断裂百分率(%)=[上清液 DNA 含量/(上清液 DNA 含量+沉淀 DNA 含量)] $\times 100\%$

1.6 线粒体膜电位测定:将胸腺细胞悬液用磷酸盐缓冲液(PBS)洗 3 次,调整细胞浓度为 2×10^6 /L,取储存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 溶于二甲亚砜(DMSO)的罗丹明 123 储存液 1 g/L,加入到上述细胞悬液中,直至终浓度为 10 g/L,37 $^{\circ}\text{C}$ 下避光染色 30 min,立即用流式细胞仪分析。

1.7 线粒体 ATP 酶、SOD 活性、MDA 含量测定:动物处死后,常规分离出完整的胸腺,置于玻璃培养皿中,用眼科剪剪碎,加入匀浆介质(0.25 mmol/L 蔗糖,1 mmol/L EDTA,5 mmol/L Tris-HCl,pH 7.4),用玻璃匀浆器手工匀浆,制成体积分数为 10% 的组织匀浆。蛋白含量测定使用研究所提供的试剂盒,按说明书的要求操作。

1.8 统计学处理:采用 SPSS10.0 分析软件,实验数据用均数士标准差($\bar{x}\pm s$)表示,计量资料用方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 光镜和电镜超微结构观察(彩色插页图 1,图 2):假手术组 12 h 和 24 h 动物胸腺无明显病理改变,胸腺细胞密集分布于胸腺皮质,细胞核呈圆形,深蓝色着色,胞质少;过渡到髓质后,逐渐以核较大而着色浅的上皮网状细胞为主。CLP 后 12 h 和 24 h 动物胸腺皮质区细胞成分稀疏,淋巴细胞减少,巨噬细胞增多,局部可见灶状坏死及散在的细胞碎片;胸腺髓质靶细胞无明显减少,细胞分布较皮质区密集,形成所谓“皮髓倒置”现象;超微结构观察表明,12 h 后可见线粒体嵴肿胀现象,24 h 可见空化。

2.2 胸腺细胞凋亡率和 DNA 断裂百分率(表 1):CLP 后 12 h 胸腺细胞凋亡即较假手术组显著增加,24 h 更加明显;DNA 断裂百分率的发生情况与细胞凋亡结果基本一致(P 均 <0.01)。

2.3 线粒体膜电位的改变:细胞经罗丹明 123 染色、流式细胞仪检测,固定标尺下可分为荧光强度低($\Delta\Psi\text{m}^{\text{low}}$)和荧光强度高($\Delta\Psi\text{m}^{\text{high}}$)的两群细胞。图 3 结果显示,CLP 后 12 h 荧光强度低的细胞显著增多,由假手术组 (2.02 ± 0.77)% 增到 (16.66 ± 1.48)% ($P<0.01$);24 h 由 (5.6 ± 0.63)% 增到 (32.46 ± 1.4)% ($P<0.05$)。

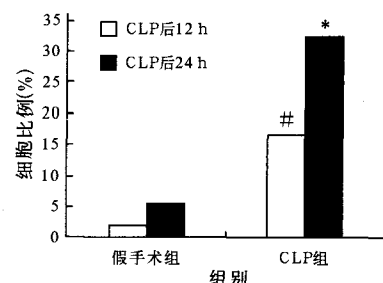
注:与假手术组比较;* $P<0.05$,# $P<0.01$

图 3 脓毒症大鼠胸腺细胞线粒体膜电位改变

表 2 两组胸腺细胞线粒体 ATP 酶活性的变化($\bar{x} \pm s, n=20$)

组别	动物数 (只)	Na ⁺ -K ⁺ -ATP 酶		Ca ²⁺ -ATP 酶	
		12 h	24 h	12 h	24 h
假手术组	20	7.95±0.13	7.20±0.17	8.66±0.18	7.84±0.14
CLP 组	20	3.66±0.13*	2.96±0.11*	6.23±0.13*	3.56±0.13*

注:与假手术组比较: *P<0.01

表 3 两组胸腺组织 SOD 活性、MDA 含量的变化($\bar{x} \pm s, n=20$)

组别	动物数 (只)	SOD(μg/mg)		MDA(μg/mg)	
		12 h	24 h	12 h	24 h
假手术组	20	29.96±0.63	24.25±0.46	0.89±0.08	1.14±0.04
CLP 组	20	19.48±0.66*	11.94±1.83*	1.47±0.70*	2.12±0.20*

注:与假手术组比较: *P<0.01

2.4 线粒体酶活性的改变(表 2):与假手术组比较,脓毒症大鼠胸腺细胞线粒体 Na⁺-K⁺-ATP 酶和 Ca²⁺-ATP 酶的活性均显著下降(P 均<0.01)。

2.5 胸腺组织 SOD 活性、MDA 含量的变化(表 3):与假手术组比较,CLP 后 12 h 胸腺组织 SOD 活性显著降低,约为假手术组的 60%,24 h 降为 50%;MDA 含量明显升高,12 h 时为假手术组的 2 倍(P 均<0.01)。

3 讨论

创伤引起的感染及其并发症一旦发生,难以控制的一个原因就是机体对感染的易感性增加,而易感性增加的机制之一是此时机体免疫功能紊乱。胸腺是免疫系统中重要的中枢器官,负责淋巴细胞的分化和成熟,同时也是机体受刺激最敏感的器官。胸腺中 T 细胞过早大量凋亡是引起机体免疫抑制的重要因素之一。多项实验证明,给啮齿类动物注射内毒素或行 CLP 均可诱导胸腺细胞凋亡^[3]。本实验探讨了 CLP 诱导的脓毒症模型动物中胸腺细胞的凋亡及其与细胞线粒体结构、功能变化的关系,以为临床改善脓毒性休克时的免疫状态提供依据和可能的途径。

脓毒性休克的发病机制复杂,但氧自由基起着重要作用。研究表明氧自由基灭活剂可保护 CLP 诱导的脓毒性休克动物^[4-5]。在脓毒症时,大量氧自由基释放形成细胞内活性氧(ROS)的堆积,ROS 具有很高的生物活性,极易与生物大分子反应,引起过氧化脂质反应,直接损害或通过一系列过氧化链式反应而引起广泛的生物结构破坏。细胞内虽有一系列的抗氧化防御机制,但在脓毒症时,机体的抗氧化能力明显下降,氧化和抗氧化作用失衡,细胞凋亡可能是这种失衡的结局之一。多种细胞暴露于低剂量的 H₂O₂ 就可被诱导凋亡,直接证

明了自由基可作为细胞凋亡的介质^[6]。本实验结果显示,CLP 后 12 h 和 24 h 胸腺组织 SOD 活性显著降低,MDA 含量显著升高,表明脂质过氧化反应加强。此时光镜下见细胞稀疏,坏死增多;流式细胞仪检测细胞凋亡也明显升高。

近年来细胞凋亡机制研究的一重大突破就是对线粒体重要性的认识。大量实验证实,许多因素诱导的细胞凋亡都存在线粒体功能紊乱^[7],并认为线粒体潜力减少是构成在体淋巴细胞凋亡早期不可逆的步骤^[8]。在正常情况下,Na⁺-K⁺-ATP 酶具有精确平衡细胞内外 Na⁺、K⁺ 浓度的作用;Ca²⁺-ATP 酶则是一种维持细胞内外 Ca²⁺ 浓度平衡的 Ca²⁺ 泵,它同 Na⁺/Ca²⁺ 交换共同维持细胞内 Ca²⁺ 稳态。脓毒性休克时,细胞内线粒体受累而引起 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性下降,可导致细胞内 Na⁺ 滞留,使细胞水肿。而 Ca²⁺-ATP 酶活性下降可严重影响膜内外 Ca²⁺ 的转运,导致细胞内 Ca²⁺ 超载,损害线粒体结构、功能促进自由基生成。本研究提示,脓毒性休克后胸腺细胞线粒体 ATP 酶活性显著下降。

线粒体也是 ROS 的主要来源和促凋亡作用靶点,ROS 主要产生于线粒体呼吸链复合物部位,可诱导线粒体通透性转换孔(MPTP)开放,膜电位降低,导致凋亡,同时促进自身线粒体及其他线粒体产生 ROS。线粒体 DNA(mtDNA)因其组成结构及功能均具有特殊性,易被自由基攻击而损伤,损伤后又因缺乏损伤修复系统而不易修复,损伤后果严重,一方面可致有氧呼吸削弱,合成减少,自由基生成增加;一方面可影响线粒体的其他功能如转膜能力等;而这两方面都与细胞凋亡相关。罗丹明 123 是一种亲脂性阳离子荧光染料,其荧光信号主要集中于线粒体,荧光强度的变化反映了线粒体膜电位的变化。本实验研究

发现,CLP 后 12 h 和 24 h 胸腺细胞线粒体膜电位均有明显下降。在大多数情况下,线粒体膜电位的降低^[9],表明线粒体 MPTP 的开放,MPTP 的开放又使线粒体释放天冬氨酸半胱氨酸蛋白酶活化物,引起细胞凋亡。

参考文献:

- 1 Wichteman K A, Baue A E, Chaudry I H. Sepsis and septic shock: a review of laboratory models and a proposal [J]. J Surg Res, 1980, 29(2): 189-201.
- 2 Burton K. A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid [J]. Biochem J, 1956, 62(2): 315-323.
- 3 Wang S D, Huang K J, Lin Y S, et al. Sepsis induced apoptosis of the thymocytes in mice [J]. J Immunol, 1994, 152(10): 5014-5021.
- 4 马超英, 江光明, 万兰清, 等. 717 复方制剂对小白鼠盲肠结扎穿孔术后所致感染性休克的影响 [J]. 中国危重病急救医学, 1996, 8(1): 10-11.
- 5 黄青青, 杨镛, 万林骏, 等. 复方丹参注射液对兔内毒素休克的防治作用 [J]. 中国危重病急救医学, 1998, 10(4): 227-230.
- 6 田晓华. 氧化应激与细胞凋亡 [J]. 军事医学科学院院刊, 1996, 15(2): 109-111.
- 7 Searlett J L, Sheard P W, Hughes G, et al. Changes in mitochondrial membrane potential during staurosporine-induced apoptosis in Jurkat cells [J]. FEBS Lett, 2000, 475(3): 267-272.
- 8 Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, et al. Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo [J]. J Exp Med, 1995, 181(5): 1661-1672.
- 9 Green D R, Reed J C. Mitochondria and apoptosis [J]. Science, 1998, 281(5381): 1309-1312.

(收稿日期: 2006-12-06)

修回日期: 2007-09-06)

(本文编辑: 李银平)

• 广告目次 •

- ①深圳迈瑞: 监护仪……………(封二)
- ②飞利浦: 监护仪……………(插页)
- ③天津生化制药: 琥珀氢可……(插页)
- ④恩华药业: 力月西……………(插页)
- ⑤天津红日药业: 血必净注射液……………(封三)
- ⑥广东天普药业: 天普洛安 ……(封底)

小鼠角质细胞生长因子重组腺病毒载体的构建

(正文见610页)

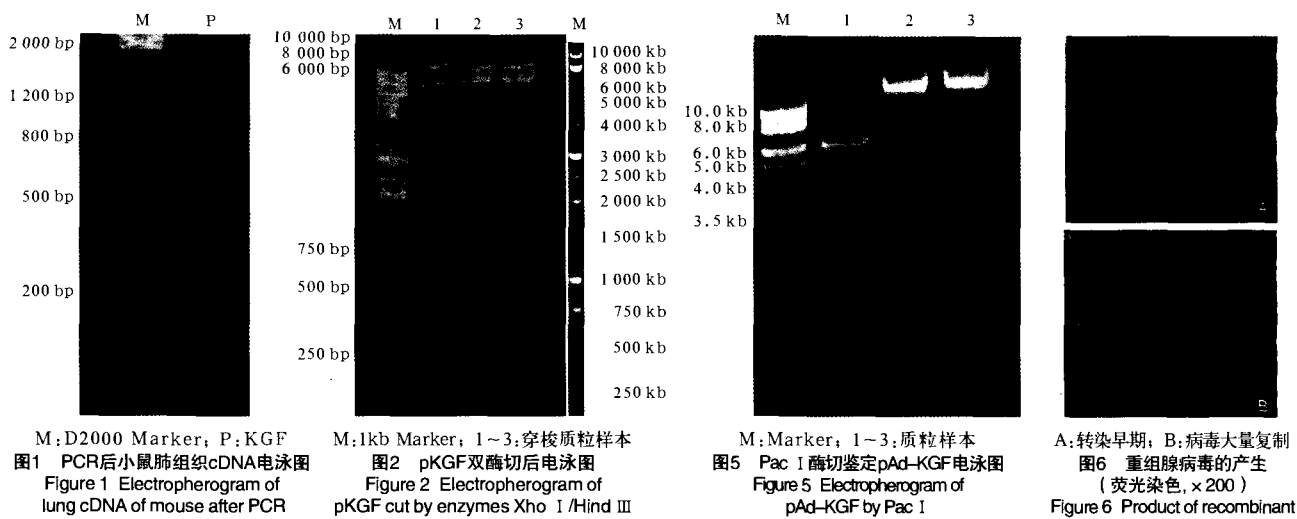


图1 PCR后小鼠肺组织cDNA电泳图
Figure 1 Electropherogram of lung cDNA of mouse after PCR

图2 pKGF双酶切后电泳图
Figure 2 Electropherogram of pKGF cut by enzymes Xho I /Hind III

图5 Pac I 酶切鉴定pAd-KGF电泳图
Figure 5 Electropherogram of pAd-KGF by Pac I

图6 重组腺病毒的产生 (荧光染色, x 200)
Figure 6 Product of recombinant adenovirus (LeI Ca, x 200)

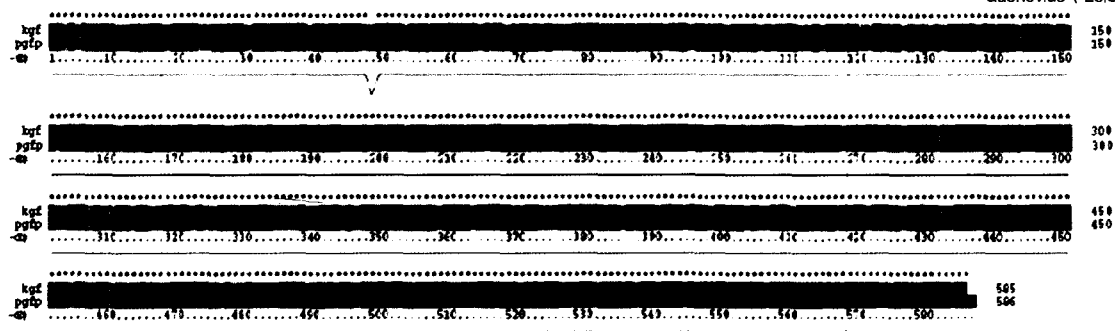


图3 pKGF测序结果与小鼠KGF基因序列的对比
Figure 3 Construct gram of pKGF gene bank and KGF gene bank of mouse



图7 显微镜下HEK293细胞感染重组腺病毒病理形态改变(TEM, x 100)
Figure 7 Pathohistological change of HEK293 cell infected by recombinant adenovirus under microscope(TEM, x 100)

脓毒症大鼠胸腺细胞凋亡及线粒体的变化

(正文见625页)

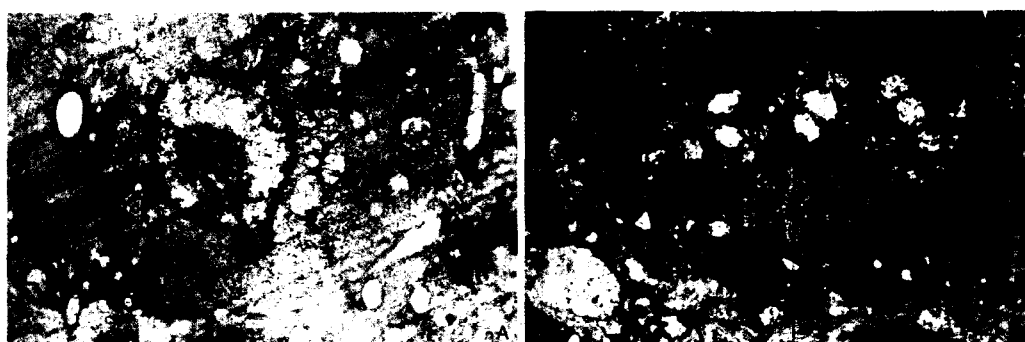


图1 CLP组线粒体超微结构改变(醋酸铀染色, x 1 000)
Figure 1 Ultrastructure change of mitochondrion in CLP group(uranyl tetraacetate, x 1 000)