

• 论著 •

脓毒症大鼠脾脏淋巴细胞凋亡的实验研究

张畔 郭聪芳 骆宁 王兵 徐新女

【摘要】 目的 观察脓毒症大鼠脾脏 T、B 淋巴细胞的数量变化及细胞凋亡情况,探讨脓毒症时免疫失衡的机制。方法 健康雄性 Wistar 大鼠 80 只,按随机数字表法分为假手术组(30 只)、模型组(50 只)。采用盲肠结扎穿孔术(CLP)制备脓毒症大鼠模型,于制模后 6、12、24、48、96 h 活杀动物取脾脏,行苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察脾脏组织病理变化;采用免疫组化法检测脾脏 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞以及 Bax、Bcl-2 蛋白表达;采用原位末端缺刻标记法(TUNEL)检测脾脏细胞凋亡指数。结果 光镜下观察模型大鼠脾脏白髓逐渐萎缩,淋巴小结结构破坏。制模 6、12、24、48、96 h,模型组大鼠脾脏 CD4⁺ T 淋巴细胞数、B 淋巴细胞数、Bcl-2 蛋白表达均较假手术组明显降低(P 均 <0.01),CD8⁺ T 淋巴细胞数与假手术组比较差异无统计学意义(P 均 >0.05),细胞凋亡指数及 Bax 蛋白表达均较假手术组显著增加(P 均 <0.01)。相关分析表明:Bcl-2 蛋白表达与细胞凋亡指数呈负相关($r=-0.659, P<0.01$),而 Bax 蛋白表达与细胞凋亡指数呈正相关($r=0.522, P<0.01$)。结论 脓毒症早期免疫功能处于紊乱状态,表现为脾脏 CD4⁺ T 淋巴细胞数、B 淋巴细胞数减少,细胞凋亡显著增加;Bax、Bcl-2 在脓毒症脾脏细胞凋亡中发挥了关键作用。

【关键词】 脓毒症; 脾; 淋巴细胞; 凋亡

Study on apoptosis of splenic lymphocytes in rats with sepsis ZHANG Pan, GUO Cong-fang, LUO Ning, WANG Bing, XU Xin-nü. Tianjin First Central Hospital, Tianjin 300192, China

【Abstract】 **Objective** To observe the change in number of spleen T lymphocytes and B lymphocytes and apoptosis of splenocytes in rats with sepsis, and explore the mechanism of immune imbalance in sepsis. **Methods** Eighty healthy male Wistar rats were randomly divided into two groups; sham operation ($n=30$) and sepsis model ($n=50$). Sepsis model was reproduced by cecal ligation and puncture (CLP). The rats were sacrificed and their spleens were obtained at 6, 12, 24, 48, 96 hours after the model was reproduced. The pathological changes in spleen were observed by optical microscopy. Immunohistochemistry method was used to examine the positive expression of CD4⁺/CD8⁺ T lymphocyte and B lymphocyte, Bax and Bcl-2. Apoptotic cells of spleen were detected by means of terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling (TUNEL). **Results** By optical microscopy, white pulps were atrophied and splenic nodules were destroyed after CLP. At 6, 12, 24, 48, 96 hours after CLP, the number of CD4⁺ T lymphocyte, B lymphocyte and Bcl-2 positive expressed cells in sepsis model group were obviously reduced as compared with sham operation group (all $P<0.01$). CD8⁺ positive lymphocytes were not significant changed (all $P>0.05$). Apoptotic splenocytes and Bax positive cells were obviously increased compared with those of sham operation group (all $P<0.01$). Correlation analysis showed that Bcl-2 expression and cell apoptosis was negatively correlated ($r=-0.659, P<0.01$), but Bax positive cells and apoptosis showed positive correlation ($r=0.522, P<0.01$). **Conclusion** Disturbance of immunological function exists in the rats with sepsis at 24 hours after CLP. The number of CD4⁺ T lymphocyte, B lymphocyte was obviously reduced, apoptotic splenocytes were obviously increased. Bax and Bcl-2 play an important role in apoptosis of splenocytes in sepsis.

【Key words】 Sepsis; Spleen; Lymphocyte; Apoptosis

脓毒症被认为是由感染引起的全身炎症反应综合征(SIRS),可进一步发展为严重脓毒症、感染性休克及多器官功能障碍综合征(MODS)。在探索脓毒症发病机制过程中,人们逐渐认识到机体并非一直处于促炎状态,免疫功能紊乱与大量淋巴细胞凋亡及免疫抑制状态密切相关^[1-2]。对死于脓毒症患者

的尸检结果显示,该类患者有广泛的免疫细胞消失,如 B 淋巴细胞、CD4⁺ T 淋巴细胞,其分别减少抗体生成、巨噬细胞激活和抗原呈递^[3]。脾脏作为机体最大的外周免疫器官,是 B、T 淋巴细胞的主要居住场所,其在脓毒症患者细胞和体液免疫应答中起关键性作用。本研究中拟观察脓毒症大鼠脾脏 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞随时间推移的数目变化、凋亡发生情况及其分子机制。

1 材料与方法

1.1 动物分组及模型制备:健康雄性 Wistar 大鼠

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2009.12.008

基金项目:天津市医药卫生中医、中西医结合科研课题(2005019)

作者单位:300192 天津市第一中心医院急救医学研究所

Email:Zhangpanyangl@eyou.com

180只,体重(200±20)g,购自天津市放射医学研究所实验动物中心(合格证号:scxki津2005-0001)。将大鼠编号后按照随机数字表法分为假手术组(30只)和模型组(50只),两组再按动物处死时间分为6、12、24、48、96h 5个亚组,假手术组每组6只,模型组每组10只。按照Chaudry等^[4]报道的方法行盲肠结扎穿孔术(CLP)复制严重腹腔感染致脓毒症动物模型,术毕皮下注射50ml/kg生理盐水抗休克。假手术组动物只行开腹、关腹手术。

1.2 检测指标及方法:分别在相应时间点处死动物,取脾脏,制备石蜡切片和冰冻切片待测。

1.2.1 脾脏组织病理观察:脾脏组织经梯度浓度乙醇脱水,二甲苯透明,常规石蜡包埋,连续切片,厚度4μm,苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察。

1.2.2 脾脏T淋巴细胞检测:制备大鼠脾脏冰冻切片,采用免疫组化法检测各组大鼠脾脏CD4⁺、CD8⁺T淋巴细胞,阳性细胞膜呈棕黄色着色。

1.2.3 脾脏B淋巴细胞检测:制备大鼠脾脏石蜡切片,采用免疫组化法检测各组大鼠脾脏CD40阳性淋巴细胞,阳性细胞膜呈棕黄色着色。

1.2.4 脾脏细胞凋亡检测:制备大鼠脾脏石蜡切片,应用原位末端缺刻标记法(TUNEL)凋亡检测试剂盒检测凋亡细胞,阳性细胞核呈棕褐色。

1.2.5 脾脏Bax、Bcl-2蛋白表达:制备大鼠脾脏石蜡切片,采用免疫组化法检测Bax或Bcl-2阳性细胞,阳性细胞质呈棕黄色着色。

1.3 图像分析及处理:应用Image pro plus 6.0图像分析系统进行图像采集及分析。光镜下低倍视野(×10)观察反应情况;每组选8张切片,每张切片随机选5个高倍视野(×40)测定积分吸光度(A)值,以凋亡细胞数占细胞总数的百分比作为凋亡指数。

1.4 统计学处理:使用SPSS 11.5统计软件进行统计学处理,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析,相关系数采用t检验,P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 动物一般情况:假手术组动物外观、活动及各项体征均正常,全部存活。模型组术后6h大鼠首先出现精神萎靡、竖毛、扎堆、耳部血管轻度充血,随后出现腹泻、腹胀、呼吸喘促、肢端厥冷、唇爪发绀等表现;6~24h上述症状渐重,24~96h上述症状渐缓。模型组6、12、24、48、96h亚组分别死亡1、3、6、5、5只大鼠,24h大鼠死亡率60%。

2.2 脾脏组织病理变化:假手术组大鼠脾脏红、白

髓结构清晰,小梁结构明显,白髓内含有大量淋巴小结。模型组大鼠术后6h脾脏红、白髓分界尚清,部分淋巴小结轻度破坏;12~24h脾脏被膜增厚,白髓减少或消失,淋巴小结结构破坏,数量减少,动脉周围淋巴鞘增厚;48~96h脾脏白髓面积逐渐恢复,淋巴小结结构破坏有所缓解。

2.3 各组动物脾脏T淋巴细胞数比较(表1;彩色插页图1):模型组术后6~96h脾脏CD4⁺T淋巴细胞数明显低于假手术组(P均<0.01),术后24h达最低。两组CD8⁺T淋巴细胞数均无明显变化,且两组间比较差异无统计学意义(P均>0.05)。

表1 两组大鼠CLP后各时间点脾脏T、B淋巴细胞数比较($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	动物数	淋巴细胞阳性表达(积分A值)		
			CD4 ⁺ T细胞	CD8 ⁺ T细胞	CD40细胞
假手术组	6h	6	94.37±15.04	57.93±9.39	101.42±26.58
	12h	6	99.88±16.13	59.91±9.43	109.99±13.26
	24h	6	98.63±18.18	58.51±12.18	104.87±30.97
	48h	6	97.95±12.19	59.94±9.18	99.50±12.39
	96h	6	98.39±8.71	58.81±10.67	100.11±9.35
模型组	6h	9	47.42±8.32*	56.23±8.12	33.86±7.45*
	12h	7	50.10±7.45*	56.29±12.35	31.74±4.07*
	24h	4	18.28±4.57*	59.60±12.00	26.96±6.26*
	48h	5	19.52±5.25*	59.78±11.42	27.46±4.78*
	96h	5	18.34±3.82*	58.21±10.40	30.68±6.12*

注:与假手术组同期比较,*P<0.01

2.4 各组动物脾脏B淋巴细胞数比较(表1;彩色插页图2):模型组术后6h起B淋巴细胞数即逐渐减少,至术后24h降至最低值,此后始终保持在较低水平,各时间点与假手术组比较差异均有统计学意义(P均<0.01)。

2.5 各组动物脾脏细胞凋亡指数比较(表2;彩色插页图3):凋亡阳性细胞首先出现在脾小体,随后出现在动脉周围淋巴鞘。模型组术后脾脏细胞凋亡指数显著增高,至24h达高峰,48h后逐渐下降。与假手术组比较,模型组各时间点脾脏细胞凋亡指数明显增高,差异均有统计学意义(P均<0.01)。

2.6 各组动物脾脏Bax、Bcl-2蛋白表达(表2;彩色插页图4):模型组术后Bax蛋白表达显著增高,48h达峰值,至96h表达明显减少,但仍高于假手术组(P均<0.01);而Bcl-2蛋白表达于术后6h显著下降,24h达最低,48h显著升高,至96h表达仍低于假手术组(P均<0.01)。

2.7 细胞凋亡与Bax、Bcl-2蛋白表达的相关性分析:Bax蛋白表达量与细胞凋亡指数呈显著正相关

($r=0.522, P<0.01$); Bcl-2 蛋白表达量与细胞凋亡指数呈显著负相关($r=-0.659, P<0.01$)。

表 2 两组大鼠 CLP 后各时间点脾脏细胞凋亡指数及 Bax、Bcl-2 蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	时间	动物数	凋亡指数 (%)	蛋白表达(积分 A 值)	
				Bax	Bcl-2
假手术组	6 h	6	3.83±1.54	13.83±3.54	131.83±3.54
	12 h	6	10.17±2.93	14.50±3.08	146.50±3.08
	24 h	6	9.75±4.39	14.67±5.24	149.67±5.24
	48 h	6	8.79±1.08	13.17±2.93	130.17±2.93
	96 h	6	6.01±3.13	11.00±5.10	112.00±5.10
模型组	6 h	9	29.73±10.36*	51.30±16.86*	38.70±13.89*
	12 h	7	38.55±24.63*	96.00±12.75*	44.99±14.29*
	24 h	4	51.67±22.54*	98.50±12.76*	20.20±11.75*
	48 h	5	40.91±21.26*	102.56±33.16*	103.41±20.14
	96 h	5	19.75±11.93*	46.10±14.74*	89.24±19.73*

注:与假手术组同期比较,* $P<0.01$

3 讨论

大量研究表明,脓毒症的发病与免疫功能紊乱密切相关,其发生发展是机体促炎/抗炎失衡所致,在两者交替失衡后,如果抗炎机制常占优势,并导致免疫抑制,则表现为淋巴细胞增殖能力下降,凋亡加速,从而使机体对病原体的易感性明显增加。

Hotchkiss 和 Karl^[1]对脓毒症患者进行大规模的前瞻性研究后发现,死于脓毒症患者的淋巴器官中细胞凋亡明显增加。众所周知,实现免疫功能的免疫器官主要由中枢和外周两部分组成。如果用中枢免疫器官胸腺或骨髓细胞进行细胞免疫和体液免疫研究要受条件限制,而脾脏则是机体最大的外周免疫器官和 T、B 淋巴细胞的来源,并在此执行免疫应答功能。因此,本实验中采用脓毒症大鼠脾脏各型淋巴细胞进行研究。

T 淋巴细胞中的主要代表 CD3 分为 CD4⁺ 和 CD8⁺ 两个主要亚群。CD4⁺ 为辅助/诱导性 T 淋巴细胞,具有辅助 T 淋巴细胞转变为效应细胞、B 淋巴细胞生成抗体以及巨噬细胞活化等功能;CD8⁺ 为抑制/杀伤性 T 淋巴细胞,与 CD4⁺ 细胞作用相反,通常情况下两者相互影响、相互制约,使机体免疫处于平衡状态。本研究中发现,制模后 24 h,模型组大鼠出现脓毒症表现,脾脏 CD4⁺ T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞数均达到低谷,而 CD8⁺ T 淋巴细胞数无明显变化,TUNEL 染色显示凋亡细胞数达到高峰,出现这些变化的原因可能与 CLP 后内毒素大量释放,刺激机体产生多种炎症介质“瀑布样”级联反应引起淋巴细胞活化有关;而 CD4⁺ 细胞与 CD8⁺ 细胞的不

同变化引起 CD4⁺/CD8⁺ 比值失调,最终导致细胞免疫功能紊乱;假手术组未出现相应的淋巴细胞变化。提示脓毒症时机体已经进入免疫抑制阶段,这也是该期实验动物死亡数最多的主要原因之一。周忠东等^[5]也发现,严重创伤患者在伤后 3 d 和 5 d 时外周血 CD4⁺ 和 CD4⁺/CD8⁺ 比值均明显下降,反映患者发生了持续免疫炎症调节功能紊乱或抑制。

Bcl-2 蛋白家族在细胞凋亡中起调节作用^[6], Bcl-2 蛋白家族包括两个蛋白亚群:一类促进细胞凋亡,以 Bax 为代表,另一类抑制细胞凋亡,以 Bcl-2 为代表。本研究中发现,模型组大鼠术后 6 h 起 Bax 蛋白表达显著增强,Bcl-2 表达急剧下降,直至 96 h 仍与假手术组有明显差异。已有的理论证实,短期激活的淋巴细胞可因 Bcl-2 的高表达而抵抗死亡受体介导的细胞凋亡,从而发挥免疫应答^[7],因此,脓毒症早期 Bcl-2 表达下降势必造成大量免疫细胞凋亡。本实验的相关分析显示 Bcl-2 与脓毒症脾细胞凋亡呈负相关也印证了这一假设。但是,淋巴细胞在脓毒症中的功能减弱可能由多种复杂的因素共同作用造成,促凋亡蛋白 Bax 表达减弱和抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达增强最终导致的失衡可能只是其中使动因素之一。本实验中仅从凋亡角度论证了脓毒症中免疫细胞的变化,为研究脓毒症发病机制提供了一定的理论依据,同时为临床判断 MODS 预后及转归提供了理论支持。

参考文献

- [1] Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*, 2003, 348(2):138-150.
- [2] Efron PA, Tinsley K, Minnich DJ, et al. Increased lymphoid tissue apoptosis in baboons with bacteremic shock. *Shock*, 2004, 21(6):566-571.
- [3] 田光,陆江阳,胡森,等.卡巴胆碱对脓毒症小鼠脾脏树突状细胞变化的影响. *中国危重病急救医学*, 2006, 18(11):684-686.
- [4] Chaudry IH, Wichterman KA, Baue AE. Effect of sepsis on tissue adenine nucleotide levels. *Surgery*, 1979, 85(2):205-211.
- [5] 周忠东,陆远强,杨林,等.血必净注射液对严重创伤患者外周血 T 淋巴细胞亚群变化的干预研究. *中国中西医结合急救杂志*, 2008, 15(2):108-110.
- [6] 符岳,肖奇明,王彤,等.多器官功能障碍综合征患者血清 sFas 和 sFasL 浓度的变化. *中国危重病急救医学*, 2006, 18(11):691-694.
- [7] Gillardon F, Lenz C, Waschke KF, et al. Altered expression of Bcl-2, Bcl-x, Bax and c-Fos colocalizes with DNA fragmentation and ischemic cell damage following middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res Mol Brain Res*, 1996, 40(2):254-260.

(收稿日期:2009-10-21 修回日期:2009-11-06)

(本文编辑:李银平)

氢化可的松对兔脓毒症早期心肌功能的影响

(正文见719页)

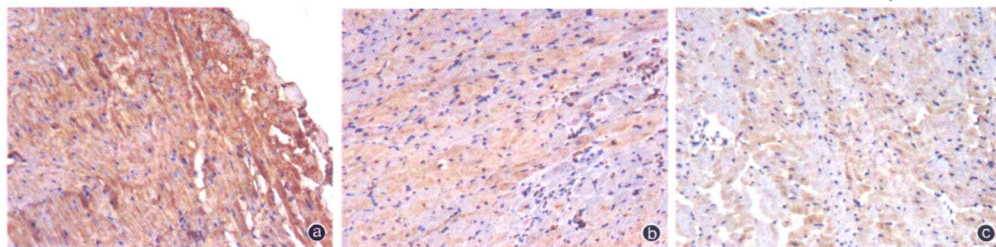


图2 光镜下观察各组动物心肌细胞iNOS表达 模型组(a)iNOS阳性细胞内见均一、较大的棕黄色颗粒;小剂量HC组(b)部分心肌细胞有均一、细密棕黄色颗粒;大剂量HC组(c)iNOS阳性表达与小剂量HC组无明显差异 SP×100

脓毒症大鼠脾脏淋巴细胞凋亡的实验研究

(正文见726页)

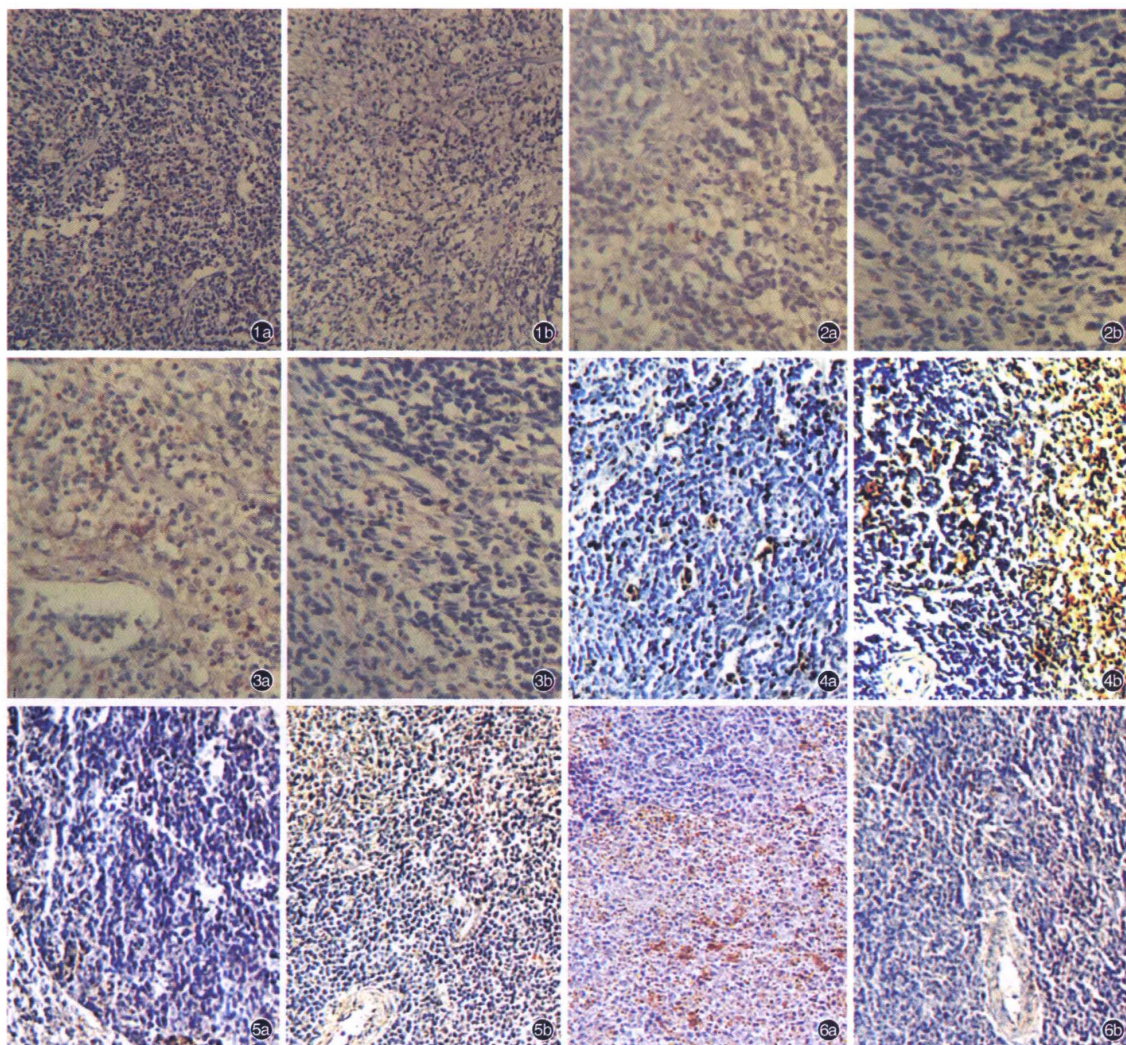


图1 光镜下观察各组大鼠脾脏CD4⁺T淋巴细胞阳性细胞膜呈棕黄色着色 假手术组(a)可见散在CD4⁺T淋巴细胞阳性表达,而模型组24h(b)时CD4⁺T淋巴细胞阳性表达微量 免疫组化×40 图2 光镜下观察各组大鼠脾脏CD8⁺T淋巴细胞阳性细胞膜呈棕黄色着色 假手术组(a)及模型组24h(b)时均可见少量CD8⁺T淋巴细胞阳性表达 免疫组化×40 图3 光镜下观察各组大鼠脾脏CD40阳性淋巴细胞膜呈棕黄色着色 假手术组(a)可见散在CD40淋巴细胞阳性表达;而模型组24h(b)时CD40淋巴细胞阳性表达微量 免疫组化×40 图4 光镜下观察各组大鼠脾脏凋亡细胞核呈棕褐色 假手术组(a)可见微量阳性细胞表达;而模型组24h(b)时可见大量阳性细胞表达 免疫组化×40 图5 光镜下观察各组大鼠脾脏Bax染色阳性细胞质呈棕黄色着色 假手术组(a)有极少量阳性细胞表达;而模型组24h(b)时可见大量阳性细胞表达 免疫组化×40 图6 光镜下观察各组大鼠脾脏Bcl-2染色阳性细胞质呈棕黄色着色 假手术组(a)有大量阳性细胞表达;而模型组24h(b)时阳性细胞表达微量 免疫组化×40