交往方面大为改善,人际关系困扰各因子也显著降低。在交谈因子、社会交往、与异性交往方面,沟通训练对不同专业、不同年级、不同年龄阶段、男性学生影响显著,女生在社会交往和人际行为总分有明显的变化,但在交谈、异性交往等因子变化不明显。分析原因,可能与样本量偏少,或者女生在交谈、与异性交往方面本身得分较低,状况较好有关。在待人接物方面,除了对20岁以下男性医学生有些改变之外,其余组别变化不明显,可能与大多数医学生在待人接物技巧,以及尊重别人方面做得较好有关,与陈秀芹[7]的研究相一致。

结合学员反馈信息发现,沟通辅导可以有效地提升他们交谈的技巧,不仅学会了如何积极有效倾听、识别别人传递的信息,与异性进行交往时能够正确地表达自己所思所想,而且对自己的认识也更加清晰,能够主动走出自我,与同龄人建立和谐关系。但同时部分同学也反映,希望在以后的训练中增加一些如何面对上下级、与父母之间、面对患者等方面的沟通技巧和方法。

本研究对提升医学生人际行为的沟通辅导方式进行了初期的有益探索,提出了团体训练和一对一心理咨询相结合的辅导方式,并对辅导效果进行了前后的对照比较,结果显示对不同年级、不同专业、不同年龄、不同性别的医学生在交谈、社交活动,以及与异性交往方面均能起到明显的促进作用。但研究本身由于缺乏空白对照组的检验导致对效果产生影响的一些混杂因素,如个人身心自然发展因素、学校班级管理因素、家庭成长背景等因素排除不够,因而需要在以后的研究中增设对照组,进一步检验沟通辅导对医学生人际行为提升的有效性。同时由于抽样的局限性,样本量偏少,性别、年级、专业等分布比例受到影响,不利于对训练效果进行分析比较,需要进一步丰富与完善研究内容。

参考文献:

[1] 梁执群,卢莉,朱素娟,等. 医科大学生人际关系敏感的影响因素研究[J]. 中国学校卫生,2004,25(2):211-212.

[2] 汪涛,谭静,李敏,等. 医学生社交焦虑与自尊和人格特征的关系[J]. 第三军医大学学报,2009,31(11):1095-1097.

[3] 刘姿,刘红,邱仿,等. 医学生人际沟通能力现状调查与分析[J]. 中国循证医学杂志,2009,9(5):522-524.

[4] 郑日昌. 大学生心理诊断[M]. 济南:山东教育出版社,1999:339-341.

[5] 汪雪莲,许能锋,杨德辉,等. 医学生的人际关系困扰及其影响因素[J]. 中国心理卫生杂志,2005,19(4):247-250.

[6] 樊富珉. 团体咨询的理论与实践[M]. 北京:清华大学出版社,1996:145-148.

[7] 陈秀芹. 大学生人际关系行为困扰的调查及对策[J]. 湛江师范学院学报,2004,25(1):138-140.

(收稿:2010-08-11;修回:2010-09-11)

(编辑 张 维)

短篇论著

文章编号:1000-5404(2010)24-2656-03

体外胆红素对L-02细胞生长与凋亡的影响

陈兆夷[1],陈兆武[2],李胜联[3],邢 伟[1] (541004 广西 桂林,桂林医学院:第一附属医院消化内科[1],公共卫生学院统计学教研室[3]:230022 合肥,安徽医科大学基因重点实验室[2])

【摘要】 **目的** 探讨胆红素对正常人肝细胞系L-02生长及凋亡的影响。**方法** 将不同浓度的胆红素(终浓度分别为0、100、150、200、250、300 mg/L)作用于体外培养的正常人肝细胞L-02,分别通过光镜、Hoechst 33258荧光染色、四甲基偶氮唑蓝(MTT)法、DNA琼脂糖凝胶电泳、流式细胞仪Annexin-V和PI双标等技术观察不同浓度胆红素对L-02细胞的相对存活率的影响、细胞的凋亡梯度和凋亡率。**结果** 经不同浓度胆红素溶液作用后,L-02细胞的增殖能力明显下降,其作用呈剂量依赖性;光镜观察显示凋亡细胞变圆,体积缩小;Hoechst 33258荧光强染;MTT法发现细胞生长受到抑制;经琼脂糖凝胶电泳发现200、250、300 mg/L胆红素溶液组可见到DNA梯形条带;流式细胞仪检测示各实验组细胞凋亡率为(1.24±0.72)%、(5.88±1.66)%、(19.69±3.52)%、(31.11±6.94)%、(57.3±8.71)%;均明显高于对照组细胞凋亡率(1.16±0.58)%($P<0.01$)。**结论** 胆红素可抑制L-02细胞生长并诱导其凋亡。

【关键词】 胆红素;L-02细胞系;细胞凋亡

【中图法分类号】 R322.47;R329.28;R363.14 **【文献标志码】** A

【通信作者】 李胜联,E-mail:lishenglian@glmc.edu.cn

高水平血清胆红素有显著的细胞毒性,可引起中枢神经系统和免疫系统功能不可逆损伤[1],在各种因素引起的肝衰竭患者中,高胆红素血症有显著的预后意义,与病死率息息相关[2]。我们在体外研究了胆红素对肝细胞的影响,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

胆红素、四甲基偶氮唑蓝(MTT)和二甲基亚砜(DMSO)购于美国Sigma公司,DMEM培养基为美国Gibco公司产品,小牛血清为杭州四季青生物制品有限公司产品,DNA特异性荧光染料Hoechst33258购自Merck公司。

1.2 主要仪器

倒置荧光显微镜(德国Leica公司),低温高速离心机(美国Sigma公司),Multiskan MK3酶标仪(美国Thermometer scientific公司),FACScan型流式细胞检测仪(美国Becton-Dickinson公司),荧光凝胶成像系统(美国Alpha Innotech公司)。

1.3 胆红素标准液的配制[3]

精确称取胆红素20 mg,溶于稀释血清80 ml(其中血清和生理盐水的比例是1∶24),加4 ml DMSO和2 ml Na_2CO_3(0.1 mmol)制成浓度为200 mg/L(342 μmol/L)的胆红素溶液。每次实验胆红素溶液均新鲜配制,所有实验步骤在弱光下进行,以防止胆红素转变为其同分异构体。

1.4 细胞培养

正常人肝细胞系L-02细胞购于南方医科大学,L-02细胞接种于体积分数15%胎牛血清的DMEM培养液中,置37 ℃培养箱中培养,平均每2~3天传代1次,实验时使用指数生长期细胞。

1.5 MTT法检测细胞的相对存活率

常规培养细胞处于对数生长期时消化传代,细胞计数并调整细胞数为1×10^4接种于96孔板中,换无血清的DMEM培养液,每孔100 μl,同时设置调零组(仅加等量PBS液),培养24 h后按不同浓度分别向各孔中加入胆红素(终浓度分别为0、100、150、200、250、300 mg/L),每浓度设10个复孔。培养24 h后每孔加入20 μl MTT(5 mg/ml),培养箱中继续孵育4 h后,弃上清液,每孔加150 μl二甲基亚砜溶解结晶,轻轻振荡10 min,全自动酶标仪测定各孔光密度值(测试波长490 nm,参考波长510 nm)。各平行孔取均值后计算细胞相对存活率,各组实验均重复3次。

1.6 Hoechst 33258荧光染色

以PBS洗上述各组L-02细胞各2次,70%乙醇4 ℃固定5 min,PBS冲洗,Hoechst33258染色10 min,荧光镜观察并拍照。

1.7 DNA琼脂糖凝胶电泳

细胞以1×10^6/ml浓度接种于6孔板中,每孔3 ml。分别于不同浓度胆红素溶液与细胞孵育后24 h收集细胞。细胞DNA的收集处理步骤参照上海美季生物公司的细胞凋亡DNA ladder检测试剂盒说明书进行。取上述各组细胞DNA样品15 μl加入3 μl Loading buffer,1.5%琼脂糖凝胶电泳(凝胶和电泳缓冲液TBE均加入0.5 μg/ml的溴化乙锭);电压为50 V,时间30 min,用Alphaimager2200凝胶成像系统观察DNA电泳带型并拍照。

1.8 流式细胞术检测细胞凋亡率

应用不同浓度胆红素溶液作用12 h后收集各组细胞(1×10^6/ml),0.25%胰酶37 ℃消化细胞,至缩呈圆形,收集细胞入离心管离心(1 000 r/min,10 min),弃上清液,冰冷PBS洗涤2次,200 μl结合缓冲液轻轻重悬细胞。加入10 μl Annexin V-异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate,FITC),4 ℃避光孵育30 min。加入300 μl结合缓冲液和5 μl碘化丙叮(PI,20 μg/ml)轻轻混匀,立即上机检测。检测在安徽省立医院中心实验室完成。

1.9 统计学方法

结果用$\bar{x}\pm s$表示,全部数据记录运用PEMS 3.1统计软件进行处理,原始数据经方差齐性检验,各组方差齐,行方差分析,组间两两比较行q检验;各组方差不齐,行秩和检验。

2 结果

2.1 胆红素对正常人肝细胞形态的影响

在倒置相差显微镜下对正常人肝细胞L-02进行观察,对照组细胞24 h形态无明显变化呈上皮型贴壁生长,细胞呈梭形或多边形;胆红素作用组的细胞可见黄染,皱缩、变圆,随时间推移而出现细胞漂浮与崩解。

2.2 胆红素对正常人肝细胞生存能力的影响

MTT法显示胆红素作用后L-02细胞的生长受到抑制。各实验组和对照组间、各实验组间差异具有统计学意义($F=74.464\,4$,$P<0.05$)。除对照组与100 mg/L实验组间比较差异无统计学意义外($q=2.464$,$P>0.05$),其余各时间组间差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.3 Hoechst33258荧光染色

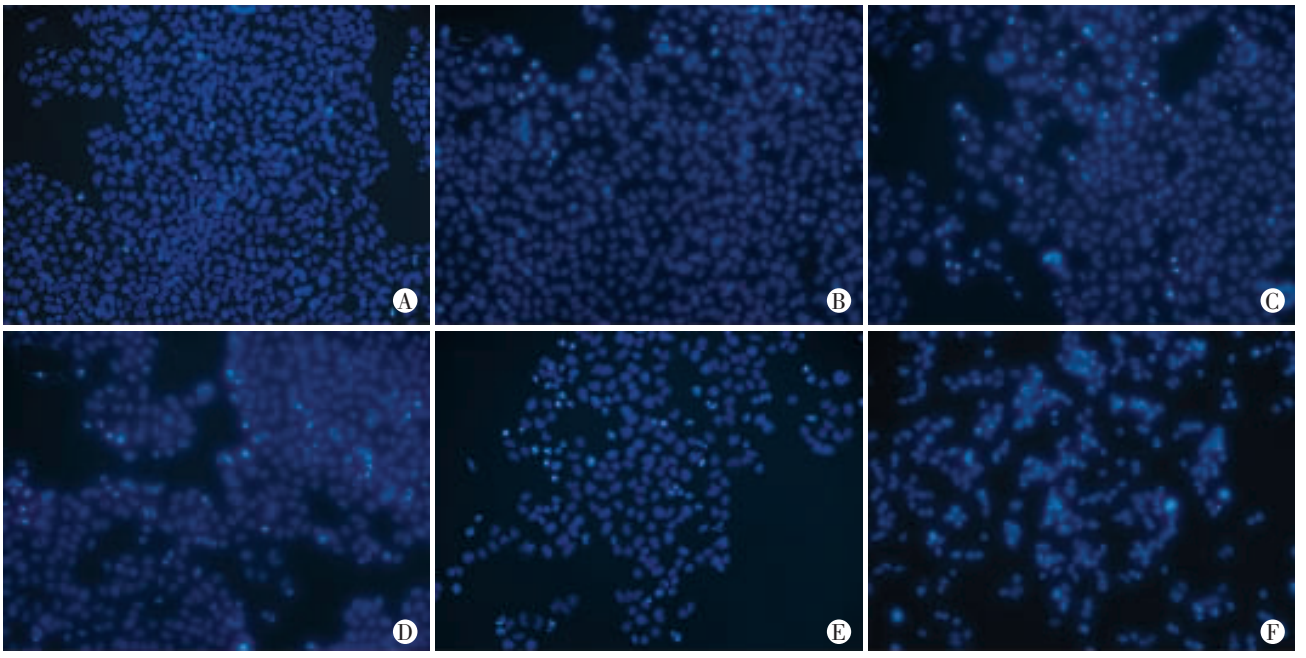
Hoechst33258荧光染色在各实验组均可见细胞凋亡,其中高浓度(200、250、300 mg/L)胆红素组更为明显,大量L-02细胞呈致密浓染,或呈碎块状致密浓染。低浓度(100、150 mg/L)胆红素组和对照组也可见少量细胞凋亡(图1)。

2.4 肝细胞凋亡的诱导及胆红素作用的DNA琼脂糖凝胶电泳图谱分析

对照组细胞琼脂糖凝胶电泳可见,DNA双链完整,相对分子质量大,滞留在加样孔附近,未形成DNA条带。胆红素溶液高浓度组(200、250、300 mg/L)出现典型的云梯状细胞凋亡的DNA ladder,随浓度增加图像更清晰、典型(图2)。

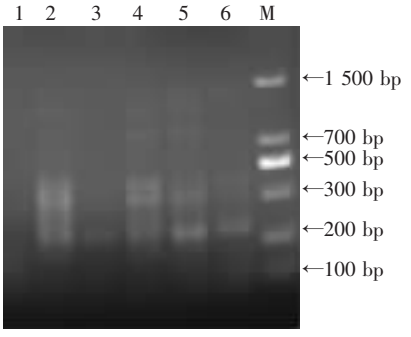
2.5 胆红素诱导L-02细胞凋亡率变化

经流式细胞仪检测,凋亡的L-02细胞分布在左上区,而正常细胞为FITC和PI均低染,分布在流式细胞分析图的左下区。早期凋亡细胞以Annexin V-FITC染色为主,在流式细胞分析图的右下区,晚期凋亡细胞则Annexin V-FITC和PI双染色,位于流式细胞分析图的右上区。各实验组细胞凋亡率为(1.24±0.72)%、(5.88±1.66)%、(19.69±3.52)%;(31.11±6.94)%;(57.3±8.71)%;均明显高于对照组细胞凋亡率(1.16±0.58)%($P<0.01$)。结果表明,胆红素能诱导L-02细胞凋亡,细胞凋亡率与胆红素浓度呈浓度-效应关系。



A、B、C、D、E、F：分别是对照组、100、150、200、250、300 mg/L胆红素处理实验组

图1 不同浓度胆红素作用L-02细胞24 h后Hoechst33258荧光染色结果 （荧光显微镜 ×200）



1－6：分别是空白对照组、100、150、200、250、300 mg/L胆红素处理实验组；M：标准

图2 不同浓度胆红素作用L-02细胞DNA琼脂糖凝胶电泳结果

3 讨论

在病理条件下，肝细胞凋亡参与严重疾病的发生、发展过程[4-6]。本实验通过Hoechst33258荧光染色观察细胞凋亡的形态学变化，Annexin-V和PI双标技术对细胞早期和晚期凋亡（继发性坏死）及坏死进行了观察和鉴别。结果表明，在高胆红素作用下，细胞先发生凋亡，随后部分凋亡细胞发生继发性坏死，其程度与胆红素浓度呈显著正相关。继发性坏死是细胞发生胞膜破裂、溶解、胞浆外泄并引发炎症反应的现象[7]。

本实验应用凋亡定性检测分析获取凋亡的直接证据和流式细胞仪定量检测细胞凋亡，分别从凋亡的早期（PI-Annexin V双染色法）和晚期（DNA片段）来确定实验的可靠性。综合分析结果发现，高胆红素可以诱导L-02细胞凋亡，并呈剂量-效应关系。在重型肝炎时，当血清胆红素含量升高时，血清丙氨酸氨基转移酶活性下降，临床上被称之为“胆酶分离”现象，可能是由于高胆红素血症诱导肝细胞过度凋亡的结果。我们认为可以通过减少细胞凋亡来阻断肝衰竭的发展。当血清胆红素到达一定水平时，应给予积极的人工肝血浆置换等治疗[8]，以防止肝细胞进一步坏死。

志谢 感谢安徽医科大学沈继龙教授、基因重点实验室和安徽省立医院中心实验室对本实验提供的帮助和支持

参考文献：

[1] Brito M A, Lima S, Fernandes A, *et al*. Bilirubin injury to neurons: contribution of oxidative stress rescue by glycoursodeoxycholic acid[J]. Neurotoxicology, 2008, 29(2): 259－269.

[2] 向德栋，张盛，王宇明，等. 477例重型病毒性肝炎预后影响因素分析[J]. 第三军医大学报，2001，23(6)：716－717.

[3] Berns M, Toennessen M, Koehne P, *et al*. Ibuprofen augments bilirubin toxicity in rat cortical neuronal culture[J]. Pediatr Res, 2009, 65(4): 392－396.

[4] Deng X, Liang J, Lin Z X, *et al*. Natural taurine promotes apoptosis of human hepatic stellate cells in proteomics analysis[J]. World J Gastroenterol, 2010, 16(15): 1916－1923.

[5] Kahraman A, Gerken G, Canbay A. Apoptosis in immune-mediated liver diseases[J]. Dig Dis, 2010, 28(1): 144－149.

[6] 李鹏，李昌平. 细胞凋亡在非酒精性脂肪性肝病中的作用[J]. 世界华人消化杂志，2008，16(20)：2253－2258.

[7] Domart M C, Esposti D D, Sebagh M, *et al*. Concurrent induction of necrosis, apoptosis, and autophagy in ischemic preconditioned human livers formerly treated by chemotherapy[J]. J Hepatol, 2009, 51(5): 881－889.

[8] 赵毅，朱芳成. 血浆置换治疗重型肝炎临床疗效分析[J]. 第三军医大学报，2009，31(15)：1517.

（收稿：2010-07-20 修回：2010-09-02）

（编辑 王小宴）