DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.13.027
第25卷第13期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 13
2003年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2003

文章编号:1000-5404(2003)13-1185-03

论著

室温保存白细胞凋亡的时相变化及分子机制初探

袁 玲[1],刘建忠[1],周 萍[2],熊仁平[2],陈利群[3],陈方祥[1] (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所:[1]输血科,[2]分子生物学中心,重庆 400042;[3]重庆市血液中心成份科,重庆 400015)

提 要:目的 研究室温保存下白细胞凋亡的时相变化及Bcl-2和Bax在其中的作用。方法 采用Annexin-V-FITC—PI双标染色,结合流式细胞术(FCM)检测细胞凋亡;以Western blot检测Bcl-2和Bax蛋白表达变化。结果 1~24 h凋亡细胞百分数逐渐增加,在24 h时达到峰值;72 h时凋亡细胞反而降低。随着保存时间的延长,坏死细胞呈由低到高的变化,而活细胞则越来越少。Western blot结果显示,1~24 h Bax表达逐渐增加,条带越来越清晰;72 h时表达反而降低。1~72 h内,Bcl-2表达逐渐降低。结论 室温保存下,白细胞逐渐凋亡坏死,活细胞数量逐渐减少;Bcl-2和Bax在调节白细胞凋亡的机制中起着重要的作用。临床应用以输用保存3~6 h的白细胞为佳。

关键词:白细胞;细胞凋亡;Western blot
中图法分类号:R329.2+8;R331.1+42;R394-33 文献标识码:A

Time-dependent changes of white blood cell apoptosis under room-temperature conservancy and its molecular mechanism

YUAN Ling, LIU Jian-zhong, ZHOU Ping, XIONG Ren-ping, CHEN Li-qun, CHEN Fang-xiang (Department of Blood Transfusion, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To study the roles of Bcl-2 and Bax in the time-dependent changes of leukocyte apoptosis under room-temperature conservancy. Methods Flow cytometry and Annexin-V-FITC-PI double-label staining were used to detect apoptosis, and Western blot was employed to determine the protein expressions of Bcl-2 and Bax. Results The percentage of apoptotic cells increased gradually since the 1st h and reached a peak at 24 h, but decreased at 72 h. The number of apoptotic cells increased in a time-dependent manner. Western blot analysis demonstrated that the expression of Bax increased gradually during the period of 1~24 h and decreased at 72 h, but the expression of Bcl-2 decreased during 1~72 h. Conclusion The number of living cells conserved at room temperature decreased in a time-dependent manner. Bcl-2 and Bax may play an important role in the regulatory mechanism in leukocyte apoptosis. Leukocytes conserved for 1~3 h may be suitable for clinical application.

Key words: leukocyte; apoptosis; Western blot

近年来,粒细胞输注量逐年下降,但由于白血病和恶性肿瘤的治疗中越来越多地使用化疗和放射治疗,治疗中患者骨髓严重受损,导致中性粒细胞计数显著下降而并发感染,需要输注白细胞(粒细胞)以增加抗感染能力。由于白细胞在体内寿命短,其输注量必须足够才能起到治疗作用。但机采白细胞在体外计数下降很快,目前临床要求从血液开始采集到输注最好在4~6 h内完成,因此对机采白细胞的保存条件研究是输血科工作者关心的课题。

以往的研究表明,4 ℃条件下白细胞与血小板很快失去作用并死亡。输血界对浓缩白细胞凋亡的研究较少,且多局限于某一时相点,缺乏对整个保存过程的研究。本研究试图通过检测白(粒)细胞在室温保存下的细胞凋亡的时相变化,以及Bax、Bcl-2蛋白在不同时相表达变化来探索白细胞凋亡的某些机制,从而为探索白细胞保存的合适条件打下基础。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

电泳仪,垂直电泳槽以及电泳转移槽(北京东方仪器厂),低温高速离心机(Backman)。SDS(Bio-rad公司产品),抗Bcl-2和Bax为兔抗人多克隆抗体(Santa Cruz, USA),脱脂奶粉(台湾产品)。

1.2 样本来源

单采浓缩白细胞由重庆市血液中心提供,每个时相点6位健康男性献血员。同一样品室温保存,分别在1、3、6、24、72 h 5个不同的时相点取样。

1.3 细胞凋亡观察

凋亡和坏死细胞定量[1]:采用Annexin-V-FITC—PI试剂盒

作者简介:袁 玲(1964—),女,四川省宜宾市人,主管技师,发表论文10篇。
电话:(023)68757221

收稿日期:2003-01-27;修回日期:2003-04-15

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

(PN IM2375, Coulter), 以 EPICS Elite(Coulter, USA)流式细胞仪检测白细胞凋亡。

1.4 蛋白提取

按文献[2]改进后实施。①浓缩白细胞 2 300 r/min×4 min 离心后弃上层血浆, 抽取中间白膜层, 以生理盐水洗涤 3 次; ②加 20 μl 不含溴酚蓝的蛋白载样缓冲液, 超声破碎(12 000 r/min, 4 ℃, 5 s×3 次)后, 离心 1 min; ③ 抽取上清, 蛋白定量。100 ℃煮沸 5 min, 每泳道 50 μg 上样量, 电泳, 积层胶电泳 50 V, 分离胶 120 V。

1.5 Western blot 方法

按文献[2]进行。分子质量根据 PDF 膜上的彩虹分子质量标准计算。Bax 分子质量为 21×10^3, Bcl-2 为 26×10^3。一抗为兔抗人 Bax 及 Bcl-2 抗体(滴度分别为 1∶400 和 1∶500), 二抗为辣根过氧化物酶标记的 IgG(1∶2 000, 美国 Sigma 公司), 用 Amersham 公司产的 ECL, X 线胶片记录影像。图像分析仪对影像进行定量分析。

1.6 统计学处理

实验数据用 SPMR 软件做配对 t 检验及方差分析。

2 结果

2.1 室温保存下白细胞凋亡、坏死及活细胞的时相变化

1~24 h, 凋亡细胞百分数逐渐增加, 在 24 h 时达到峰值($P<0.01$); 72 h 时凋亡细胞反而降低。随着保存时间的延长, 坏死细胞呈由低到高的变化($P<0.01$), 而活细胞则越来越少($P<0.01$), 见表 1。

表 1 室温保存下白细胞凋亡、坏死及活细胞的时相变化(%, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Time-dependent changes of apoptotic, necrotic and living cells of leukocytes kept in room temperature(%, $\bar{x}\pm s$)

	n	Apoptotic cells	Necrotic cells	Living cells
1 h	6	7.2±1.6	8.5±2.1	80.6±2.6
3 h	6	9.5±1.9 *	13.7±1.4 **	71.2±2.1 **
6 h	6	18.4±2.0 **	15.3±1.8 **	56.6±2.4 **
24 h	6	31.5±2.4 **	44.7±2.7 **	8.3±3.1 **
72 h	6	1.2±0.4 **	98.3±3.4 **	0.6±0.1 **

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* 1 h

2.2 Bax 及 Bcl-2 蛋白表达的时相变化

Western blot 结果显示, 1~24 h, Bax 表达逐渐增加, 条带越来越清晰; 72 h 时表达反而降低。1~72 h 内, Bcl-2 表达逐渐降低, 结果见图 1。

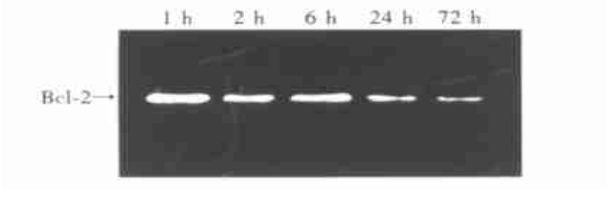


图 1 单采白细胞不同时相 Bcl-2 蛋白 Western blot 分析

Fig 1 Western blot analysis of Bcl-2 in white blood cells during different storing time at room temperature

3 讨论

细胞凋亡(Apoptosis)是指为维持内环境稳定, 由基因控制的细胞自主的有序的死亡, 既包括生理性的程序性死亡(Programmed cell death), 又指由外来因素(生理性和非生理性)诱发的细胞自杀(Suicide)。白(粒)细胞保存过程中逐渐凋亡或坏死。在坏死和凋亡之间存在一种"开关分子", 内源性或外源性刺激物作用于这种"开关分子"使之活化或失敏, 从而决定细胞的最后归宿——凋亡或坏死。随着保存时间的延长, 凋亡细胞最终也是坏死。凋亡或坏死导致活细胞计数的下降。本实验采用的是 Annexin-V-FITC-PI 双标法, 能较好地区分开凋亡细胞、坏死细胞及活细胞。本研究结果显示, 1~24 h, 随着保存时间的延长, 凋亡细胞百分数逐渐增加, 在 24 h 时达到峰值($P<0.01$); 72 h 时凋亡细胞反而降低。随着保存时间的延长, 坏死细胞呈由低到高的变化($P<0.01$), 而活细胞则越来越少($P<0.01$)。本研究中, 6 h 时细胞凋亡已经达到(18.4±2.0)%, 尽管坏死细胞的比例相对增加不多, 但大量的细胞已经开始凋亡, 活细胞的比例显著下降。24 h 时凋亡细胞比例更是高达(31.5±2.4)%, 此时显微镜下白细胞虽然结构完整, 但其活性已经很低。因此, 依笔者的观点, 临床应用以输注保存 3 h 以内的白细胞, 最长不宜超过 6、24 h 后的白细胞输注临床意义不大, 与文献[3]单采白细胞在 20~24 ℃最多储存 24 h 的观点不同。

细胞凋亡这一过程是细胞信号转导、生化改变、酶激活及基因调控等多方面联合作用的结果, 受细胞内外许多因子调节, 其确切机制目前尚不十分清楚。原癌基因 bcl-2 定位于线粒体外膜、内质网膜及核外膜, 编码 26×10^3 的膜蛋白, 能阻止细胞凋亡。它的相关基因有 bax、bcl-x 及 mcl-1[4], 其中 bcl-XS 及 bax 可促进细胞凋亡, 而 bcl-XL 和 mcl-1 则抑制之。bax 在结构上与 bcl-2 有广泛的同源性, Bax 与 Bcl-2 大约有 21%的氨基酸序列同源。在体内 Bax 形成同源二聚体或与 Bcl-2 形成异源二聚体。Bcl-2 抑制细胞凋亡必须通过与 Bax 形成的异源二聚体形式才能实现[5], Bcl-2 抑制细胞凋亡, Bax 则促进细胞凋亡的发生, Bcl-2/Bax 的比例决定着细胞的命运[6]。本研究通过 Western blot 法对室温保存下的人单采白细胞 Bcl-2 及 Bax 蛋白表达水平进行了动态观察, 结果显示: Bax 表达在 1~24 h 内逐渐增加, 尤其是 24 h 时达到峰值, 72 h 时表达降低; Bcl-2 表达在 1~72 h 内逐渐降低。研究表明, Bax 的过度表达诱导了白细胞凋亡, 而 Bcl-2 则抑制白细胞

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

的凋亡。Bax 在 72 h 的表达反而较 24 h 低，可能是由于白细胞大量坏死破碎的缘故。

本研究证实了 Bcl-2 和 Bax 在单采白细胞凋亡中的调节作用，但其作用方式尚不清楚，一些学者[7]认为其作用机制有是通过以下三条通道来实现的：①通过调节抗氧化系统阻止细胞凋亡发生；②通过调节细胞内 Ca^{2+} 在细胞器间流动和蛋白质穿越核膜来抑制细胞凋亡；③通过阻断细胞凋亡的最后基因通路而抑制之。因此，关于 Bcl-2 和 Bax 参与细胞凋亡的分子通道尚不明了，其作用机制仍有待进一步地深入研究。

参考文献：

[1] Van Den Eijnde S M, Boshart L, Baehreke E H, *et al*. Cell surface exposure of phosphatidylserine during apoptosis is phylogenetically conserved[J]. Apoptosis, 1998, 3(1): 9—13.
[2] 熊仁平，周元国. 蛋白免疫印迹法在 G 蛋白检测中的应用[J]. 第三军医大学学报，1998, 20(2): 145—148.
[3] 吕 鹏. 最新输血技术学[M]. 北京：人民卫生出版社. 1994. 154
[4] Kanduc D, Mittelman A, Serpico R, *et al*. Cell death: apoptosis versus necrosis (review)[J]. Int J Oncol, 2002, 21(1): 165—170.
[5] Goodsell D S. The molecular perspective: Bcl-2 and apoptosis[J]. Stem Cells, 2002, 20(4): 355—356.
[6] Vaskivuo T E, Stenback F, Tapanainen J S. Apoptosis and apoptosis-related factors Bcl-2, Bax, tumor necrosis factor-alpha, and NF-kappaB in human endometrial hyperplasia and carcinoma[J]. Cancer, 2002, 95(7): 1463—1471.
[7] Benito A, Grillot D, Nuenz G T, *et al*. Regulation and function of bcl-2 during differentiation-induced cell death in HL-60 promylocytic cells[J]. Am J Pathol, 1995, 146(2): 481—485.

（编辑 薛国文）

文章编号：1000-5404(2003)13-1187-01

个案与短篇

纳洛酮治疗苯二氮䓬类药物急性中毒临床观察

Clinical observation of naloxone in treatment of acute poisoning due to benzodiazepine

汪 毅，李海华 （重庆合川市人民医院急救中心内科，合川 401520）

我们自 1998 年 5 月至 2001 年 11 月用纳洛酮治疗急性苯二氮䓬类(Benzodiazepine，BDZ)药物中毒病人 113 例，并设 1994 年 3 月至 1998 年 4 月收治的 118 例 BDZ 为对照组，观察其催醒时间及并发症。探讨纳洛酮在抢救急性 BDZ 药物中毒时的临床意义，现报告如下。

1 资料与方法

1.1 药品来源

纳洛酮由军事医学科学院毒物药物研究所生产。

1.2 临床资料

治疗组 113 例，男性 20 例，女性 93 例，年龄 11～51 岁，轻度中毒 50 例，中度中毒 38 例，重度中毒 25 例，BDZ 中毒药物分别是安定 41 例，硝基安定 3 例，氯硝安定 6 例，舒乐安定 45 例，三唑仑 18 例，服药后就诊时间 0.30～2.26 h。对照组 118 例，男性 23 例，女性 95 例，年龄 14～52 岁。轻度中毒 53 例，中度中毒 39 例，重度中毒 26 例，BDZ 中毒药物分别是安定 42 例，硝基安定 4 例，氯硝安定 7 例，舒乐安定 47 例，三唑仑 18 例，服药后就诊时间 0.35～2.42 h。全部病例符合急性镇静催眠药中毒的诊断及分类标准[1]。两组在上述诸方面均无统计学差异。

入院后均给予洗胃、导泻、吸氧、纠正水、电解质及酸碱平衡，中重度中毒病人酌情给予降低颅内压、利尿治疗，呼吸困难者加用呼吸兴奋剂，昏迷者加用美解眠。治疗组：在此基础上，轻度中毒用纳洛酮 0.4～0.8 mg/h，中度中毒用纳洛酮 0.8～1.2 mg/h，重度中毒用纳洛酮 1.2～2.0 mg/h 静滴，或按每 kg 体质量 0.01～0.04 mg/min 加入 5%～10%葡萄糖 500 ml 持续静滴，直到病人清醒为止。

用药期间严格观察病人呼吸、心率、血压、意识状态及有无并发症，准确记录病人清醒时间。

1.3 统计学方法

计量资料组间比较采用 t 检验，率的比较采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 两组催醒所需时间比较

治疗组催醒所需时间较对照组明显缩短，有非常显著性差异($P<0.01$)，见表 1。

表 1 两组催醒时间比较(t/h，$\bar{x}\pm s$)

组别	n	中毒程度		
		轻度	中度	重度
治疗组	113	0.8±0.18*	2.24±0.86*	7.21±3.13*
对照组	118	2.14±0.91	5.76±1.72	27.03±6.94

*：$P<0.01$ 与对照组相比较

（下转 1190 页）

作者简介：汪 毅(1962—)，男，重庆市人，主治医师，主要从事神经内科方面的研究，发表论文 5 篇。电话：(023)42720953

收稿日期：2002-09-23；修回日期：2003-03-18

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net