DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.11.010
第23卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 11
1276 2001年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)11-1276-03

内毒素脂多糖对培养肾小管上皮细胞凋亡和增殖的影响

闫振成[1],贾昆霞[1],张建国[1],黄庆愿[2],朱妙珍[1] (第三军医大学:[1]附属大坪医院野战外科研究所肾内科,重庆 400042;[2]高原军事医学系病理生理学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 观察肾小管上皮细胞(Tubular epithelia cell,TEC)在含内毒素脂多糖(Lipopolysaccharide,LPS)微环境中细胞凋亡和功能改变,探讨LPS直接损害肾小管的机制。方法 在含内毒素LPS的介质中体外培养肾小管上皮细胞,检测不同时相细胞凋亡、增殖能力及分泌肿瘤坏死因子-α(Tumor necrosis factor α,TNF-α)能力的变化。结果 LPS有明显的抑制TEC增殖,促进TEC分泌TNF-α,且随着LPS浓度的增大,其作用更为明显;LPS还具有明显促细胞凋亡作用,呈剂量依赖性;相关分析表明,细胞凋亡与LPS促TEC分泌TNF-α的量有明显正相关。结论 LPS可抑制TEC增殖,促进细胞凋亡,可能是通过TNF-α而起作用,这可能是LPS导致脓毒症性肾衰或急性间质性肾炎小管间质损害的机制之一。

关键词:肾小管上皮细胞;内毒素;肾损害
中图法分类号:R322.61;R329.28;R996 文献标识码:A

Effects of lipopolysaccharide on apotosis and proliferation of cultured tubular epithelial cells

YAN Zhen-cheng, JIA Kun-xia, ZHANG Jian-guo, HUANG Qing-yuan, ZHU Miao-zhen (Department of Nephrology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To explore the effects of lipopolysaccharide (LPS) in culture medium on the apotosis and function of cultured tubular epithelial cells (TEC). Methods Purified human TECs were cultured in the medium containing LPS of different concentration. The apotosis, prolifera-tive ability and production of TNF-α were determined at various stages of culture. Results LPS restrained the proliferative ability of TEC obviously and enhanced the apotosis and the production of TNF-α in a dose-dependent manner. The percentage of apotosis had a positive correlation with the production of TNF-α by TEC. Conclusion The inhibition of TEC proliferation and the enhancement of apoptosis induced by LPS might depend on TNF-α, which may be one of the mechanisms of LPS inducing tubulo-interstitial damage in acute renal failure or acute tubulo-interstitial nephritis.

Key words: tubular epithelial cell; endotoxin; renal injury

急性肾功能衰竭(Acute renal failure,ARF)是临床危重急症,病死率较高,其中脓毒症引起的ARF逐年增多,且脓毒症引起的急性间质性肾炎也较为多见。而内毒素LPS是G^-菌脓毒症过程中最重要的介质。由于肾脏是代谢产物及毒素排泄的主要途径,LPS经肾小管重吸收后,使TEC处在高浓度LPS微环境中,可能对TEC结构和功能产生重要的影响。最近人们注意到LPS可能引起TEC直接损害,在ARF和急性间质性肾炎的发生发展中起着重要的作用。研究发现,大鼠缺血再灌注肾脏中发现短暂缺血后细胞死亡以凋亡为主,提示细胞凋亡可能参与急性肾小管损害。那么LPS是否可引起肾小管上皮细胞凋亡及其机制,这将有助于我们更好地把握ARF和急性间质性肾炎的治疗时机及转归,以便于寻求促进其恢复的有效措施。为此,我们建立人TEC培养,研究LPS可能诱导人TEC凋亡,并对其引起细胞凋亡的机制进行探讨。

1 材料和方法

1.1 人TEC的分离、鉴定和培养[1,2]

采用机械网筛法。在无菌条件下,取经合法人工流产术终止妊娠的人胎肾,剪切肾皮质,研磨后依次通过280、150、98 μm筛网,洗下98 μm面上肾小管,再次滤过98 μm,加压冲洗,最后收获肾小管,经1640培养液漂洗,镜检肾小管纯度大于90%,然后经0.01%胰蛋白酶消化,用相差显微镜形态学鉴定和碱性磷酸酶染色证实。取第3代细胞,调整细胞浓度为1×10^6/ml,在含10%胎牛血清的1640培养液(Sigma公司)中培养。

1.2 LPS对TEC产生TNF-α的影响

实验分为4组:实验对照组;LPS低剂量组(5 ng/ml),LPS中剂量组(10 ng/ml),LPS大剂量组(100 ng/ml)。每组7复孔,于实验6、12、24 h后收集上清液,检测上清液中TNF-α含量。人TNF-α酶联检测试剂盒由军事医学科学院提供,按照试剂盒说明操作。

1.3 LPS对TEC增殖能力的影响

上述各组培养12 h,结束前4 h,每孔加入5mg/ml浓度的四甲基偶唑氮蓝(MTT)(sigma公司)20μl。继续培养4 h,吸弃培养上清液,每孔加入150μl二甲基亚砜,使结晶物充分溶解。选择490nm波长,在酶标仪上测各孔光密度(D_{490})值。

1.4 流式细胞仪检测[3]

上述各组分别处理12 h后,行以下处理:①收集各组的全部悬浮细胞和贴壁细胞(约1×10^6细胞);②离心去上清,反复吹散使细胞分散成单个,加入足量冰预冷的70%乙醇混匀,4℃固定3 h以上;③离心去上清,PBS漂洗,制备0.5 ml混匀单细胞悬液;④加入RNA酶A终浓度为50 μg/ml。37℃消化1 h。⑤加入碘化丙啶至终浓度为50 μg/ml,4℃避光染色1 h后经流式细胞仪,进行细胞凋亡分析。

作者简介:闫振成(1966—),男,河北省张家口市人,博士研究生,讲师,主要从事肾小球疾病的发病机制的研究,发表论文10篇。电话:(023)68757446

收稿日期:2001-02-10;修回日期:2001-06-07

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

1.5　统计学处理

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用 t 检验。组间细胞凋亡比例的比较用 χ^2 检验及相关分析。

2　结果

2.1　LPS 对 TEC 分泌 TNF-α 的影响

LPS 可促进 TEC 分泌和释放 TNF-α, 随着浓度的增高作用愈益明显, 呈剂量依赖性, 尤以作用 12 h 最为明显, 24 h 后促分泌作用减弱, 见表 1。

表 1　LPS 对 TEC 分泌 TNF-α 作用的影响(ng/ml)

Tab 1　Effect of LPS on the production of TNF-α by TEC(ng/ml)

Group	6 h	12h	24 h
Control	19.2±8.4	20.7±5.3	21.1±4.9
Low dosage of LPS	50.7±5.2☆☆△△	65.0±10.8☆☆△△	47.1±4.8☆☆△△
Median dosage of LPS	58.8±8.6☆☆△△	81.1±11.0☆☆△△★	71.4±8.9☆☆△△★★
High dosage of LPS	354.3±28.5☆☆	478.5± 42.2☆☆	392.8±34.5☆☆

☆☆: $P<0.05$ *vs* control; △△: $P<0.05$ *vs* high doseage LPS; ★: $P<0.05$, ★★: $P<0.01$ *vs* low doseage LPS

2.2　LPS 对 TEC 增殖能力的影响

LPS 对 TEC 有明显的抑制增殖作用($P<0.05$), 随着 LPS 浓度的增高作用愈益明显($P<0.05$), 见表 2。

表 2　LPS 对 TEC 细胞增殖的影响

Tab 2　Effect of LPS on the proliferation of TEC

Group	n	D_{490}
Control	7	0.39±0.035
Low dosage of LPS	7	0.24±0.044☆☆△
Median dosage of LPS	7	0.25±0.053☆☆△
High dosage of LPS	7	0.19±0.047☆☆

☆☆: $P<0.01$ *vs* control; △: $P<0.05$ *vs* high dosage LPS

2.3　流式细胞仪检测

对照组 TEC 的凋亡细胞比例为(2.4±0.5)%, 低剂量 LPS 组为(4.5±0.6)%, 中剂量 LPS 组为(7.3±0.8)%, 高剂量 LPS 组为(45±5.3)%, LPS 各组与对照组相比均 $P<0.01$。且随着 LPS 浓度的增高, TEC 凋亡比例也增高($P<0.01$)。

2.4　相关分析

在 12 h 时相点, LPS 低剂量组细胞凋亡的比例与所产生的 TNF-α 量无明显相关($P>0.05$), 而 LPS 中剂量组和高剂量组细胞凋亡与产生 TNF-α 量呈明显正相关(分别为 $r=0.76$, $r=0.88$)。

3　讨论

已有研究证实, 在严重创伤、烧伤、休克、重症感染等应激状态下, 来自于肠道的和感染部位的内毒素大量进入体内引起炎症介质的大量合成、释放, 最终发生脓毒血症。脓毒血症被认为是引起创伤性急性肾衰和急性间质性肾炎的常见原因[4]。而 LPS 是 G^- 菌脓毒症过程中最重要的介质。ARF 的主要病理改变是 TEC 坏死、脱落及间质水肿。除了缺血, 炎症介质的作用外, 内毒素直接作用 TEC 造成肾小管损害, 可能是脓毒症引起 ARF 的机制之一[5]。由于肾脏是代谢产物、毒素排泄的重要途径, 而经肾小管重吸收的水和毒素, 使上皮细胞处在较高浓度的 LPS 微环境中, 导致 TEC 结构和功能改变, 可能使 TEC 脱落, 微绒毛碎片。管型形成, 间质水肿, 进而肾小管阻塞。现研究认为 ARF 的致病机制是多环节的, 肾血流动力学改变和急性肾小管损害为主要因素, 有作者从急性肾衰尿液中可检测到明显的细胞凋亡, 因此, 细胞凋亡过度可能参与急性肾小管阻塞, 这些结果主要是从缺血性 ARF 研究所得。目前研究脓毒症肾衰及肾炎的发生主要是 LPS 继发的炎症细胞产生介质的作用。探讨 LPS 直接引起 TEC 损害的机制对 ARF 的发生有重要的作用。

在多细胞生物中内环境的稳定是由细胞增殖和细胞凋亡的平衡来维持的。流式细胞仪是检测细胞凋亡十分准确可靠的手段之一。我们研究发现, 在 LPS 微环境中 TEC 增殖受到抑制, 随着 LPS 浓度的增高这种抑制作用愈益明显($P<0.01$)。在 12 h 最为明显, 而国内在研究 LPS 对单核细胞作用时, 以 24 h 作用为最明显[6], 我们在研究对 TEC 作用时, 以 12 h 作用最为明显, 这可能与细胞种类不同有关。LPS 可促进 TEC 分泌 TNF-α, 呈剂量依赖性; 我们利用流式细胞仪检测发现, LPS 可促进 TEC 凋亡加剧, 呈剂量依赖性, 也以 12 h 的作用为最明显, 且细胞凋亡的比例与分泌的 TNF-α 量呈正相关。因而, 我们认为, LPS 促 TEC 凋亡的机制可能是通过 TNF-α 而起作用。我们的研究结果表明, LPS 既抑制细胞增殖, 又加速 TEC 凋亡, 可能是 LPS 迅速导致急性肾衰或急性间质性肾炎发生发展的原因。LPS 是脓毒症过程中重要介质, 它通过与脂多糖结合蛋白结合而起作用[7]。其机制可能是, LPS 刺激 TEC 分泌 TNF-α, TNF-α 可明显促进细胞凋亡, 还可激活单核-巨噬细胞产生一系列炎症介质, 如 TNF-α, IL-1[8]。在机体内可促进中性粒细胞滞留于肾间质, 激活自由基直接损害细胞的 DNA[9]。最近研究还发现, LPS 可介导鼠肾小管上皮细胞表达单核细胞趋化蛋白-1(Monocyte chemoattactant protein-1, MCP-1), 呈剂量依赖性, MCP-1 是重要的趋化介质, 趋化单核细胞向炎症部位转移, 并激活其溶酶体酶, 产生 IL-1、IL-6 等, 核因子 KappaB 在此过程中, 起关键性的作用[10,11]; 在中毒性肾炎, MCP-1 可促进巨噬细胞介导的肾小管损伤, 表明 LPS 是介导上皮细胞表达 MCP-1 的重要介质[12]。用杀菌-通透性增加蛋白治疗烫伤大鼠, 可中和体内毒素, 具有保护重要脏器损伤的作用[13]。因此, 认为 LPS 是脓毒症肾衰发生发展的重要因素, 在 LPS 引起的急性肾衰和急性间质性肾炎的治疗中, 使用阻断 LPS 作用机制的制剂可能是今后治疗的方向。

参考文献:

[1] 郑　丰, 黎磊石. 大黄对体外肾小管细胞增殖的影响[J]. 中华医学杂志, 1993, 73(6): 343-345.

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

[2] Aled O, Philis R S, Topley N, *et al*. Elevated d-glucose concentrations modulate TGF-β 1 synthesis by human cultured renal proximal tubular cells. [J] Am J Pathol, 1995, 147(1): 362—373.
[3] 高瑞通, 郑法雷, 刘彦信, 等. 马兜铃酸诱导的 LLC—PK1 细胞凋亡及其意义[J]. 中华肾病杂志, 1999, 15(3): 162—165.
[4] Yao Y M, Redl H, Bahrami S, *et al*. The inflammatory basis of trauma/shock associated multiple organ failure[J]. Inflamm Res, 1998, 47(1): 201—210.
[5] Kang Y H, Falk, Falk M C, Bently T B, *et al*. Distribution and role of lipopolysaccharide in the pathogenesis of acute renal proximal tubule injury [J]. Shock, 1995, 4: 441—449.
[6] 侯凡凡, 张 迅, 陈平雁. 单核细胞在含内毒素的微环境中分化时表型与功能的改变[J]. 中华微生物和免疫学杂志, 2000, 20(4): 335—339.
[7] Su G L, Freeswick P D, Geller D A, *et al*. Molecular cloning, characterization, and distribution of rat lipopolysaccharide binding protein[J]. J Immunol, 1994, 153(2): 743—752.
[8] Yao Y M, Bahrami S, Leichtfried G, *et al*. Pathogenesis of hemorrhage-induced bacteria/endotoxin translocation in rats: effects of recombinant bactericidal/permeability-increasing protein[J]. Ann Surg, 1995, 221(4): 398—405.
[9] 郭德玉, 谯怡然. 内毒素引起肾损害的实验研究[J]. 中华肾脏病杂志, 1997, 13(3): 173—174.
[10] Yi-ping Wang, Gopala K Rangan, Bryan Goodwin, *et al*. Lipopolysaccharide-induced MCP-1 gene expression in rat tubular epithelial cells is nuclear factor-kappaB dependent[J]. Kidney Int, 2000, 57(5): 2 011—2 022.
[11] Rangan G K, Wang Y, Tay Y C, *et al*. inhibition of NfkappaB activation with antioxidants is correlated with reduced cytokine transcription in PTC [J]. Am J Physiol, 1999, 277(5 pt2): F779—789.
[12] Gregory H. Tesch, Andreas Schwarting, Koji. Kinoshita, *et al*. Monocyte chemoattractant protein-1 promotes macrophage-mediated tubular injury, but not glomerular injury, in nephrotoxic serum nephritis[J]. J Clin Invest, 1999, 103(1): 73—80.
[13] 方文惠, 姚咏明, 施志国, 等. 杀菌-通透性增加蛋白对烫伤大鼠脂多糖结合蛋白和 CD14 mRNA 表达的影响[J]. 中华医学杂志, 1999, 79(4): 289—292.

(编辑 陈聪连)

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2001)11-1278-01

长时间呼吸机支持治疗病人的心理分析和护理

Psychoanalysis and nursing for patients with long-stanging ventilafor therapy

钟红玲, 李 天真 (第三军医大学附属西南医院急救部, 重庆 400038)

我科于 1998-08—1999-05 共收治需长时间呼吸机支持治疗病人 17 例, 其中严重创伤、休克致 ARDS 10 例, 大手术后呼吸功能不全 4 例, 严重神经肌肉疾患 2 例, 破伤风 1 例。本组病人使用呼吸机及时间均在 7 d 以上, 最长达 62 d, 均具有病情严重, 长期卧床, 活动严重受限, 丧失口头语言表达能力的特征。

经过我们严密的观察, 本组病人在使用呼吸机后均产生了非常复杂的心理活动。所有的患者均对 ICU 病室环境和仪器运作、报警声音感到恐惧(占 100%)。甚至感到绝望, 产生精神障碍, 如谵望、幻觉(占 25%)。有 11 例患者表现为紧张易怒(占 75%), 突发严重疾病对患者的重创和使用呼吸机过程中的身体不适让患者对治疗产生对抗情绪, 表现为对各种刺激紧张易怒。有 3 例患者产生怀疑情绪(占 18%), 有 8 例患者有严重的焦虑情绪(占 47%), 主要是对病情预后和治疗费用感到焦虑。文献[1]报道焦虑会导致心跳加快、心慌、手脚麻木等症状, 观察中, 我们发现焦虑患者有明显的心动过速。我们还发现所有的患者都渴望亲人、朋友和医护人员的关心(占 100%)。

讨论

在本组病例的护理过程中, 我们强调针对不同患者的个性特征采用他们最易接受的方式。对文化素质高, 心理素质较好的病人重点调动其内在潜质, 详细解释病情和治疗, 让其正确认知疾病, 增强对疾病的心理承受能力。对文化程度低, 心理素质差的病人, 尽量减少不良应激源, 控制周围的干扰因素, 同时调动亲属的安慰作用, 在不影响病情的情况下, 适当安排亲属陪护, 使病人增强勇气树立信心。

病人丧失口头语言表达能力, 情绪激动易怒, 护士耐心的和病人进行手势、口型、表情等非语言方式的交流, 仔细体会病人想表达的意思。床旁常规备一硬板和纸笔, 让可以写字的病人用文字表达。在实践中, 我们发现可以用文字表达意思的病人心理状态明显好于不能用文字表达的病人。

在治疗护理操作中, 进行间接的心理护理也很重要。有 1 例青年男性患者, 使用呼吸机过程中特别惧怕吸痰, 每次吸痰都用力摇头抗拒, 我们对他详细解释吸痰对防止肺部感染的重要性, 在吸痰过程中, 特别注意动作轻柔, 适时吸痰, 为其擦干汗液, 在操作中体现出对病人的体贴关爱, 该患者在后来的治疗中都能积极的配合, 痊愈出院。

去除对病人产生不良心理刺激的因素[2], 如寒冷、疼痛、噪音, 保持病室空气新鲜, 物品干净整洁。抢救病人时以屏风遮挡, 避免其他病人感到恐惧、紧张。还要注意维护病人的自尊感, 避免裸露, 必要的检查和治疗可用屏风遮挡。

(致谢: 感谢刘明华博士悉心指导!)
关键词: ICU; 呼吸机; 心理护理
中图法分类号: R472 文献标识码: B

参考文献:

[1] 史铁英. ICU 患者的心理护理. 实用护理杂志, 1997, 13(6): 235—236.
[2] 吴渭虹. 护理行为对住院病人心理影响的调查[J]. 中华护理杂志, 1999, 34(2): 106—107.

(编辑 陈聪连)

作者简介: 钟红玲(1977—), 女, 护师; 主要从事危重病人的鉴测与护理方面的研究。电话: (023)68754000-73046

收稿日期: 2001-01-18; 修回日期: 2001-06-18

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