

生长抑素诱导猕猴外周血中性粒细胞凋亡

许兰涛, 唐承薇

许兰涛, 唐承薇, 四川大学华西医院消化内科 四川省成都市 610041
许兰涛, 男, 1964-07-03 生, 副主任医师, 副教授, 博士, 主要从事消化内科的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30170875

项目负责人: 唐承薇, 610041, 四川省成都市, 四川大学华西医院消化内科.
sccdix@sohu.com

电话: 028-85445341

收稿日期: 2004-12-22 接受日期: 2005-01-20

Effect of somatostatin on apoptosis of polymorphonuclear neutrophils of rhesus monkey

Lan-Tao Xu, Cheng-Wei Tang

Lan-Tao Xu, Cheng-Wei Tang, Department of Digestology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China
Supported by National Science Foundation of China, No.30170875

Correspondence to: Cheng-Wei Tang, Department of Digestology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. sccdix@sohu.com

Received: 2004-12-22 Accepted: 2005-01-20

Abstract

AIM: To study the effect of somatostatin on the apoptosis of polymorphonuclear neutrophils (PMNs) in rhesus monkey.

METHODS: PMNs were isolated from whole blood of normal rhesus monkey using one-step discontinuous Percoll gradient centrifugation technique. PMNs were cultured with 5×10^{-5} mol/L somatostatin. Cell morphology was examined by light and electronic microscopy. Apoptosis was detected by flow cytometry and DNA agarose electrophoresis.

RESULTS: Somatostatin at 5×10^{-5} mol/L induced significant apoptosis in PMNs. The cells manifested typical apoptotic morphology: cell membrane blebbing, chromatin condensation, nucleic fragmentation and apoptotic body formation. Agarose electrophoresis revealed specific DNA ladder. Flow cytometry analysis showed that the ratio of PMNs undergoing apoptosis was remarkably increased from 22.1% to 50.5% following somatostatin treatment ($P < 0.01$).

CONCLUSION: Somatostatin induces apoptosis of PMNs in rhesus monkey. It may be a new target for the treatment of multiple organ dysfunction syndrome (MODS).

Key Words: PMN; Apoptosis; Somatostatin; Rhesus monkey; MODS

Xu LT, Tang CW. Effect of somatostatin on apoptosis of polymorphonuclear neutrophils of rhesus monkey. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(5):617-620

摘要

目的: 观察生长抑素对猕猴外周血中性粒细胞的作用。

方法: 用生长抑素与猕猴外周血中性粒细胞共同孵育一定时间后, 采用流式细胞仪、DNA电泳、电镜观察猕猴外周血中性粒细胞的形态变化, 细胞DNA含量分布变化。

结果: 生长抑素能诱导猕猴外周血中性粒细胞凋亡, 在形态学上表现为细胞膜起泡、染色质固缩、核碎裂、凋亡小体形成;电泳呈凋亡特征性Ladder带;流式细胞仪分析显示, PMN凋亡比例增高(22.1% vs 50.5%, $P < 0.01$)。

结论: 生长抑素能诱导猕猴外周血中性粒细胞凋亡。

关键词: 猕猴; 生长抑素; 中性粒细胞; 凋亡; 多器官功能衰竭

许兰涛, 唐承薇. 生长抑素诱导猕猴外周血中性粒细胞凋亡. *世界华人消化杂志* 2005;13(5):617-620

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/617.asp>

0 引言

中性粒细胞(polymorphonuclear neutrophil, PMN)是白细胞中功能最活跃、寿命最短的一类^[1-2]. PMN不仅可以释放氧自由基、蛋白酶和炎症递质^[3-4], 并且可以与刺激因素相互作用引起瀑布效应(cascade reaction)^[5-6], 诱发多器官功能衰竭(MODS)^[7-8]. 由于PMN生存周期很短, 除了从黏膜表面脱落外, 通常以凋亡和坏死的方式被清除. 当PMN发生坏死时, 炎症反应扩大, 造成周围组织损伤. 如PMN发生凋亡, 则可以被巨噬细胞或组织细胞识别并吞噬, 这是生理条件下PMN快速更替的方式. 而在病理条件下, 如炎症、感染、MODS时PMN清除方式变化, PMN凋亡与疾病的发生发展及转归的关系密切^[9-17], PMN凋亡的分子机制及调控正是目前科研领域的一个研究热点. 对这些问题的解答将揭示MODS过程中PMN的作用地位, 及提出针对MODS早期组织损伤的防治措施. 生长抑素(somatostatin, ss)是一种脑肠肽, 他不仅广泛存在于中枢神经系统和胃肠道, 在淋巴器官中也有分布. 近3 a来发现, 生长抑素除抑制脑垂体中生长激素的释放外对免疫系统

也有广泛的作用, 研究表明生长抑素能减少组胺及肿瘤坏死因子等细胞因子的释放, 从而逆转 MODS 的发展, 恢复各脏器功能^[18-21]. 我们研究生长抑素对中性粒细胞的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 Percoll 分离液, 右旋糖酐 Dextran, Hanks 液、RPMI 1640 培养液、苏木素(Merk, Germany)、台盼蓝、瑞氏一姬姆萨染液、裂解液、细胞凋亡试剂盒购自博士德公司, Annexin V FITC 购自晶美公司. 从健康猕猴外周静脉取血 5 mL, 肝素抗凝, 低速离心弃去富含血小板血浆, 余血用右旋糖酐Dextran 500 沉降红细胞, 将上层细胞悬液置于Percoll 分离液, 以 630 g/L Percoll 和 720 g/L percoll 液密度梯度离心收集 PMN, 2 500 r/min, 10 min, 用 Hanks 液洗涤两次, 2 500 r/min, 10 min, 残留红细胞以冰冷等渗氯化铵溶液(NH₄Cl 155 mmol/L, KHCO₃ 10 mmol/L, EDTA 0.1 mmol/L)按 9:1 溶解, 再用 Hanks 液清洗 2 遍, 悬浮于含 100 mL/L 的小牛血清的 RPMI 1640 液中, 并调至 5×10⁸/L, 分类计数 PMN 为 95% 以上, 细胞完整, 台盼蓝试验表明 99% 为活细胞.

1.2 方法 在培养状态下, 用倒置显微镜观察细胞生长状况及形态学改变, 并将 5×10⁻⁵ mol/L 的生长抑素作用 30 min 的细胞在显微镜下观察凋亡细胞的形态. 流式细胞仪检测, 正常情况下分离出 PMN, 取两管 5×10⁸/L PMN 细胞分别与终浓度为 5×10⁻⁵ mol/L、5×10⁻⁶ mol/L 的生长抑素作用 30 min, 另取 5×10⁸/L 细胞不加药作为对照. 中性粒细胞用 PBS 洗涤二次; 离心后除去上清液, 加入 100 μL 缓冲液; 拿另一只试管加入 5 μL Annexin v; 再加入 10 μL 碘化丙锭; 加 100 μL 标本, 在避光处孵育 15 min; 加入 400 μL PBS; 上机检测. 将 5×10⁸/L PMN 和 5×10⁻⁵ mol/L 生长抑素作用细胞离心, 然后抽提 DNA 并电泳. PMN 加入 DNA 消化液 500 μL, 蛋白酶 K 5 μL; 37℃ 水浴摇床

摇动 2 h, 取出后过夜; 加等体积苯酚、氯仿、异戊醇(25:24:1)震荡混匀, 形成乳浊液, 各抽提一次; 10 000 g 离心 15 min, 离心后上层为清亮水相, DNA 溶解在其中, 若混有下层液体, 则按上述方法再抽提一次; 将上层为清亮水相吸取移至另一新管, 用大口吸管, 以免损伤 DNA. 加入 1/10 体积 3 mol/L 醋酸钠约 40 μL, 2.5 倍体积冷无水乙醇, 上下倒置混匀, 放入 -20℃ 冰箱 30 min; 12 000 g 离心 20 min, 弃上清; 加入冷乙醇 1 mL; 12 000 g 离心 5 min. 弃上清, 将沉淀溶于 40 μL TE 液中; 制胶, 用 TAE 100 mL 溶解 2 g 琼脂糖, 制成凝胶, 在 80V 电压条件下, 电泳 30 min, 紫外光透射仪下观察电泳条带并拍照. 将 5×10⁸/L PMN 细胞与 5×10⁻⁵ mol/L 生长抑素作用 30 min, PBS 清洗 2 次, 25 g/L 戊二醛固定 24 h, PBS 缓冲液漂洗 3 次, 每次 15 min, 10 g/L 锇酸固定 1 h, 漂洗后经梯度丙酮逐级脱水, Epon 812 包埋, LKP-2088 型超薄切片机切片, 醋酸铀-枸橼酸铝染色后, 透射电镜下观察摄片.

统计学处理 数据以均数±标准差(mean±SD)表示, 应用方差分析处理数据, 比较各实验组与对照组, 确定结果差异的显著性.

2 结果

2.1 细胞形态学变化 未经生长抑素作用的中性粒细胞未见凋亡细胞和凋亡小体, (图 1A) 而猕猴外周血经生长抑素作用后显微镜观察见中性粒细胞体积变小, 膜起泡, 核浓缩, 凋亡小体形成(图 1B).

2.2 流式细胞仪检测(表 1)

表 1 不同浓度生长抑素对 PMN 凋亡率的影响

	组别	凋亡率(%)
1	对照组	22.1 ± 0.28
2	ss (5 × 10 ⁻⁶ mol/L)	33.6 ± 0.52
3	ss (5 × 10 ⁻⁵ mol/L)	50.5 ± 0.56

P<0.01 vs 对照组.

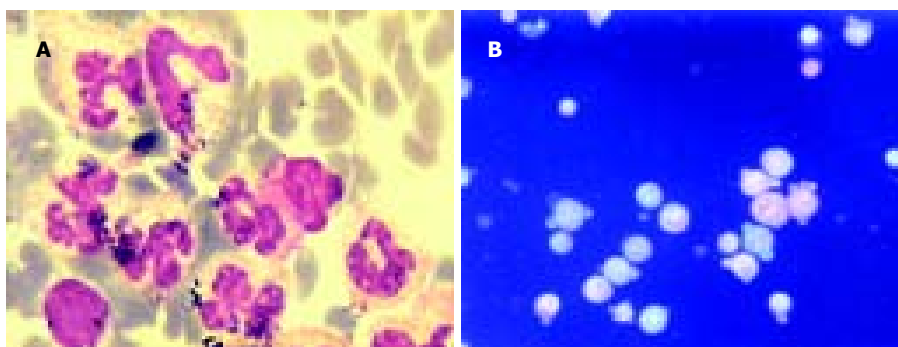


图 1 中性粒细胞. A: 无凋亡图; B: 凋亡.

2.3 DNA 电泳结果 将 5×10^8 /L PMN 细胞与 5×10^{-5} mol/L 生长抑素作用 30 min, DNA 电泳呈明显凋亡带, 对照组则无凋亡带(图 2).

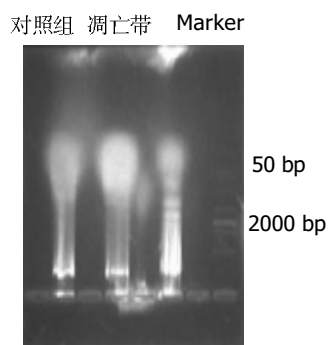


图2 DNA 电泳 Ladder 带.

2.4 电镜观察 将 5×10^8 /L PMN 细胞与 5×10^{-5} mol/L 生长抑素作用 30 min, 电镜下可见染色质固缩, 聚集于核膜下成块状, 胞核固缩, 染色质凝集, 细胞质浓缩, 部分细胞碎裂成片, 形成质膜包被的大小不等的凋亡小体(图 3).

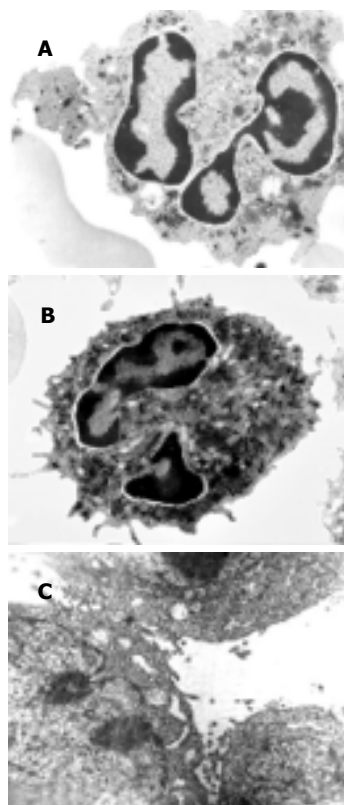


图3 中性粒细胞超微结构 TEM $\times 8000$. A: 正常; B: 凋亡; C: 凋亡小体.

3 讨论

由于分子生物学发展, 尤其是抗炎症递质治疗在临床应用中并不理想后, 国内外学者转向炎症递质调控凋亡的研究, 就凋亡和 MODS 发生机制作了新的探讨. Haslett^[22-26]提出炎症反应的失调与中性粒细胞凋

亡比率有关. Keele^[27-30]在 MODS 研究中发现外周血中性粒细胞(PMN)凋亡延迟, 并且血中有抗凋亡因子存在. 认为凋亡延迟引起 PMN 寿命延长可能与 MODS 发生有关. Goris^[31]提出经过特异性细胞因子触发凋亡可以解释进行性过度炎症反应可以发展到 MODS 的最后假说.

目前已经明确 MODS 是过度炎症反应的结果, 在创伤后有 MODS 高风险的患者中, PMN 凋亡延迟, 血浆中的递质使 PMN 凋亡延迟, 并且 PMN 的作用引发过度炎症反应及器官损伤, 创伤后 PMN 的凋亡在 MODS 的发生发展中可能具有重要作用. 凋亡区别于坏死的重要之处是凋亡的细胞能被巨噬细胞或周围组织细胞平稳识别、清除而不引发炎症反应, 因此有研究认为通过凋亡方式清除炎症部位的 PMN 是限制组织损伤, 促进炎症吸收的重要机制. 识别清除凋亡 PMN 的能力降低, 大量凋亡的 PMN 不能被及时有效地处理而裂解坏死, 炎症不易控制, 因此这种损伤很容易导致 MODS. 本实验研究表明: 生长抑素能诱导中性粒细胞凋亡, 可以减少氧自由基、蛋白酶和炎症递质的释放, 有利于巨噬细胞的吞噬, 必将为治疗 MODS 开辟新的领域.

4 参考文献

- 1 Diamond RD, Clark RA, Haudenschild CC. Damage to *Candida albicans* hyphae and pseudohyphae by the myeloperoxidase system and oxidative products of neutrophil metabolism *in vitro*. *J Clin Invest* 1980;66:908-917
- 2 Sweeney JF, Nguyen PK, Omann G, Hinshaw DB. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor rescues human polymorphonuclear leukocytes from ultraviolet irradiation-accelerated apoptosis. *J Surg Res* 1999;81:108-112
- 3 Suzuki K, Hasegawa T, Sakamoto C, Zhou YM, Hato F, Hino M, Tatsumi N, Kitagawa S. Cleavage of mitogen-activated protein kinases in human neutrophils undergoing apoptosis: Role in decreased responsiveness to inflammatory cytokines. *J Immunol* 2001;166:1185-1192
- 4 Sweeney JF, Nguyen PK, Hinshaw DB. Caspase-3 inhibition partially protects oxidant production in apoptotic human neutrophils. *J Surg Res* 2001;98:66-70
- 5 Sun XM, MacFarlane M, Zhuang J, Wolf BB, Green DR, Cohen GM. Distinct caspase cascades are initiated in receptor mediated and chemical induced apoptosis. *J Biol Chem* 1999;274:5053-5060
- 6 Kobayashi SD, Voyich JM, DeLeo FR. Regulation of the neutrophil-mediated inflammatory response to infection. *Microbes Infect* 2003;5:1337-1344
- 7 Fry DE. Sepsis syndrome. *Am Surg* 2000;66:126-132
- 8 Erwig LP, Gordon S, Walsh GM, Rees AJ. Previous uptake of apoptotic neutrophils or ligation of integrin receptors downmodulates the ability of macrophages to ingest apoptotic neutrophils. *Blood* 1999;93:1406-1412
- 9 Chitnis D, Dickerson C, Munster AM, Winchurch RA. Inhibition of apoptosis in polymorphonuclear neutrophils from burn patients. *Leukoc Biol* 1996;59:835-839
- 10 Dunican A, Grutkoski P, Leuenroth S, Ayala A, Simms HH. Neutrophils regulate their own apoptosis via preservation of CXCR2 receptors. *J Surg Res* 2000;90:32-38
- 11 Sano J, Oguma K, Kano R, Tsumagari S, Hasegawa A. Decreased apoptotic polymorphonuclear leukocyte rate in dogs with pyometra. *J Vet Med Sci* 2004;66:103-105
- 12 van Zandbergen G, Gieffers J, Kothe H, Rupp J, Bollinger A,

- Aga E, Klinger M, Brade H, Dalhoff K, Maass M, Solbach W, Laskay T. Chlamydia pneumoniae multiply in neutrophil granulocytes and delay their spontaneous apoptosis. *J Immunol* 2004;172:1768-1776
- 13 Nolan B, Collette H, Baker S, Duffy A, De M, Miller C, Bankey P. Inhibition of neutrophil apoptosis after severe trauma is NF kappaB dependent. *Trauma* 2000;48:599-605
- 14 Milik AM, Buechner-Maxwell VA, Sonstein J, Kim S, Seitzman GD, Beals TF, Curtis JL. Lung lymphocyte elimination by apoptosis in the murine response to intratracheal particulate antigen. *J Clin Invest* 1997;99:1082-1091
- 15 Stockmeyer B, Beyer T, Neuhuber W, Repp R, Kalden JR, Valerius T, Herrmann M. Polymorphonuclear granulocytes induce antibody-dependent apoptosis in human breast cancer cells. *J Immunol* 2003;171:5124-5129
- 16 Gilroy DW, Colville-Nash PR, McMaster S, Sawatzky DA, Willoughby DA, Lawrence T. Inducible cyclooxygenase-derived 15-deoxy(Delta)12-14PGJ2 brings about acute inflammatory resolution in rat pleurisy by inducing neutrophil and macrophage apoptosis. *FASEB J* 2003;17:2269-2271
- 17 Wagner C, Iking-Konert C, Deneffle B, Stegmaier S, Hug F, Hansch GM. Granzyme B and perforin: constitutive expression in human polymorphonuclear neutrophils. *Blood* 2004;103:1099-1104
- 18 Thompson JS. Epidermal growth factor inhibits somatostatin-induced apoptosis. *J Surg Res* 1999;81:95-100
- 19 Sener G, Sehirli AO, Satioglu H, Kacmaz A, Ayanoglu-Dulger G, Yegen BC. Octreotide improves burn-induced intestinal injury in the rat. *Peptides* 2003;24:123-127
- 20 Kobayashi SD, Braughton KR, Whitney AR, Voyich JM, Schwan TG, Musser JM, DeLeo FR. Bacterial pathogens modulate an apoptosis differentiation program in human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:10948-10953
- 21 Liu Y, Zhang J, Zhao Z, Ling Y. Pro-apoptotic role of NF-kappaB pathway inhibition in lipopolysaccharide-stimulated polymorphonuclear neutrophils. *Chin Med J (Engl)* 2003;116:1257-1261
- 22 Haslett C. Resolution of acute inflammation and the role of apoptosis in the tissue fate of granulocytes. *Clin Sci (Lond)* 2001;83:639-648
- 23 Liu R, Li SD, Min JX, Xiao N, Jiang QS, Tian KL, Diao YF. PMN apoptosis and its relationship with the lung injury after chest impact trauma. *Chin Med J (Engl)* 2004;117:888-892
- 24 McLoughlin RM, Witowski J, Robson RL, Wilkinson TS, Hurst SM, Williams AS, Williams JD, Rose-John S, Jones SA, Topley N. Interplay between IFN-gamma and IL-6 signaling governs neutrophil trafficking and apoptosis during acute inflammation. *J Clin Invest* 2003;112:598-607
- 25 Solito E, Kamal A, Russo-Marie F, Buckingham JC, Marullo S, Perretti M. A novel calcium-dependent proapoptotic effect of annexin 1 on human neutrophils. *FASEB J* 2003;17:1544-1546
- 26 Reidy MF, Wright JR. Surfactant protein A enhances apoptotic cell uptake and TGF-beta1 release by inflammatory alveolar macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;285:L854-L861
- 27 Keel M, Ungethüm U, Steckholzer U, Niederer E, Hartung T, Trentz O, Ertel W. Interleukin-10 counterregulates proinflammatory cytokine-induced inhibition of neutrophil apoptosis during severe sepsis. *Blood* 1997;90:3356-3363
- 28 Miyazaki S, Ishikawa F, Fujikawa T, Nagata S, Yamaguchi K. Intraperitoneal injection of lipopolysaccharide induces dynamic migration of Gr-1-high polymorphonuclear neutrophils in the murine abdominal cavity. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004;11:452-457
- 29 Choi M, Rolle S, Wellner M, Cardoso MC, Scheiderei C, Luft FC, Kettritz R. Inhibition of NF-kappaB by a TAT-NEMO-binding domain peptide accelerates constitutive apoptosis and abrogates LPS-delayed neutrophil apoptosis. *Blood* 2003;102:2259-2267
- 30 Kobayashi SD, Voyich JM, Braughton KR, DeLeo FR. Down-regulation of proinflammatory capacity during apoptosis in human polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol* 2003;170:3357-3368
- 31 Goris RJ. MODS/SIRS: result of an overwhelming inflammatory response? *World J Surg* 1996;20:418-421

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

世界华人消化杂志 2005 年由月刊改为半月刊

本刊讯 中国科技期刊引证报告(2003 年版): 2002 年度世界华人消化杂志总被引频次 4151, 影响因子 1.926, 即年指标 0.424, 他引总引比 0.45, 引用刊数 173, 扩散因子 4.2, 被引半衰期 2.99, 地区分布数 26, 机构数 138, 国际论文比 0.03, 基金论文比 0.27. 2002 年度各学科影响因子较高的 3 种期刊排名: 世界华人消化杂志影响因子 1.926, 临床医学排名第 2 位. 2002 年度总被引频次较高的 20 种期刊排名: 世界华人消化杂志总被引频次 4151, 排名第 1 位. 世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊, 《中文核心期刊要目总览》2004 年版内科学类的核心期刊, 中国科技论文统计源期刊, 2001 年度第一届中国百种杰出学术期刊, 2003 年度中国百种杰出学术期刊. 世界华人消化杂志的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》, 俄罗斯《文摘杂志》收录. 为适应我国消化病学专业基础与临床研究的快速发展, 从 2005 年开始, 世界华人消化杂志将由月刊改为半月刊, 大 16 开, 160 页, 每月 1, 15 日出版, 24 元/期, 全年 24 期, 邮发代号 82-262, 北京报刊发行局发行. (世界胃肠病学杂志 2004-06-15)