

· 基础论著 ·

脓毒症对红系造血祖细胞发育的影响

栗雅杰 孔雅娴 王蓓蓓 苑少欣 李彤 曾辉 张剑平

【摘要】 目的 利用小鼠盲肠结扎穿刺模型探讨脓毒症对红系造血祖细胞发育的影响。**方法** 将C57 BL/6小鼠分成假手术组和脓毒症组,采用盲肠结扎穿刺术(CLP)建立小鼠脓毒症模型。分别于术后1、3和7 d采用流式细胞仪检测小鼠骨髓和脾脏红系造血前体细胞数量和比例的变化。**结果** 与假手术组相比,脓毒症组小鼠骨髓中的巨核细胞-红细胞前体细胞(MEP)比例和数量显著降低;而其脾脏中MEP的比例和数量则有所增加。**结论** 脓毒症模型小鼠骨髓红系造血显著减少,脾脏的红系造血代偿性增加。

【关键词】 脓毒症; 红系造血; 巨核细胞-红细胞前体细胞; 髓外红系造血

Effects of sepsis on development of erythroid precursors LI Ya-jie, KONG Ya-xian, WANG Bei-bei, YUAN Shao-xin, LI Tong, ZENG Hui, ZHANG Jian-ping. Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University; Beijing Key Laboratory of Emerging Infectious Diseases, Beijing 100015, China

Corresponding author: ZENG Hui, Email: zenghui@ccmu.edu.cn; ZHANG Jian-ping, Email: zhjp2358@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of sepsis on development of erythroid precursors with mouse model which received cecal ligation and puncture (CLP). **Methods** The mice were divided into two groups. The sepsis model mice built by CLP were taken as sepsis group and sham operation mice were taken as the control group. The changes of red blood cell precursors in bone marrow and spleen were analyzed with flow cytometer at the 1st, 3rd and 7th day after CLP, respectively. **Results** Compared with the control group, the number and proportion of megakaryocytic-erythroid progenitor cells (MEP) in bone marrow of sepsis group decreased significantly. Meanwhile, sepsis mice showed an increased number and frequency of MEP in spleen. **Conclusions** Erythropoiesis in bone marrow of sepsis mice reduced significantly, along with an increase in spleen compensatorily.

【Key words】 Sepsis; Erythropoiesis; Megakaryocytic-erythroid progenitor cells; Extramedullary erythropoiesis

脓毒症(sepsis)是临床常见的危重病症和主要的死亡原因之一。贫血是脓毒症患者的常见并发症,也是导致这些危重患者死亡的重要危险因素^[1]。有文献报道95%的重症监护患者在进入重症监护室(intensive care unit, ICU) 3 d内均会发生贫血^[2],而脓毒症患者贫血症状更为严重,其血红蛋白浓度较其他患者低并且持续下降^[3],但其具体发生机制尚不明确。

红细胞是由骨髓中的造血干细胞(hemopoietic

stem cell, HSC)发育而来^[4]。HSC分化成为共同髓系祖细胞(common myeloid progenitor cells, CMPs),继而产生巨核细胞-红细胞前体细胞(megakaryocytic-erythroid progenitor cells, MEPs)^[5],MEP具有向红系和巨核系分化的功能^[6],早期有核红细胞在促红细胞生成素的作用下经过早幼红细胞、晚幼红细胞、网织红细胞等阶段,发育为成熟的红细胞^[7]。本研究通过脓毒症动物模型,从红系造血祖细胞发育角度,探讨脓毒症发生贫血的机制。

材料和方法

一、实验动物

本研究采用SPF级C57BL/6小鼠,雄性,鼠龄6~8周,

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2013.02.001

基金项目:北京市卫生系统高层次卫生技术人才培养计划(No. 2009-2-13)

作者单位:100015 北京,首都医科大学附属北京地坛医院传染病研究所;新发突发传染病研究北京市重点实验室

通讯作者:曾辉, Email: zenghui@ccmu.edu.cn;

张剑平, Email: zhjp2358@126.com

体重20~23 g, 由中国医学科学院动物研究所提供。

二、试剂和材料

抗-CD127-Biotin、抗-CD34-FITC、抗-CD16/32-PE和抗-Biotin Mouse Lineage Panel均购自美国BD公司; 抗-Sca-1-Biotin购自Biolengd公司。

三、方法

1. 脓毒症动物模型的建立: 参照Wichterman等^[8]和Rittirsch等^[9]报道的操作方法建立CLP诱导脓毒症动物模型。采用戊巴比妥钠腹腔注射麻醉, 腹中线切口; 用6/0号丝线结扎在盲肠末端和近端的中点位置, 用18号针头于盲肠穿刺并挤出少量肠内容物以保持穿刺孔开放; 将盲肠还纳腹腔并逐层关腹, 术后于皮下注射1 ml生理盐水。假手术组小鼠仅进行开腹和分离盲肠, 作为对照组。

2. 制备小鼠骨髓和脾脏单细胞悬液: 分别于术后第1、3、7 d处死小鼠, 分离小鼠双股骨和胫骨, 用2 ml针管吸取适量流式染色液吹出骨髓细胞, 反复吹打为单细胞悬液; 迅速分离小鼠完整的脾脏, 制备单细胞悬液。

3. 流式细胞检测: 参照文献^[10]染色方法进行小鼠巨核细胞-红细胞前体细胞染色, 其中Mouse Lineage Panel包括抗-CD127、抗-Sca-1。利用FACS Calibur流式细胞仪进行检测。

三、统计学处理

采用SPSS 13.0软件对数据进行统计分析。应

用两独立样本 t 检验比较假手术组与CLP组的相关指标。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、脓毒症对小鼠骨髓红系前体细胞的影响

与假手术组相比, 脓毒症1 d的小鼠骨髓中巨核细胞-红细胞前体细胞 (MEP) 的比例和数量即显著降低, 随后持续下降 (P 均 < 0.001), 见表1、图1。本研究证实对照组小鼠MEP不同时间点均无明显变化, 因此, 其MEP水平即表示为0 d组。

二、脓毒症对小鼠脾脏红系前体细胞的影响

与对照组相比, 脓毒症1 d和3 d的小鼠脾脏中MEP的比例和数量稍有下降, 但随后可恢复, 7 d时显著升高 (P 均 < 0.01), 见表2、图2。

讨 论

贫血是脓症患者发病过程中的一个常见现象, 随着疾病的进展, 患者血红蛋白的浓度持续降低。正常情况下, 作为一种代偿机制, 机体发生贫血时促红细胞生成素 (erythropoietin, EPO) 分泌明显增加。但是脓毒症时血中EPO的水平并未随血红蛋白的下降而明显升高^[11-12], 提示脓毒症发生贫血的一个重要原因是EPO受到抑制。有研究表明这可能与IL-1等炎性因子抑制了肾脏EPO的基因表达, 从而抑制了EPO的合成和分泌有关。另外, 危重病

表1 各组小鼠骨髓中不同时间点MEP百分比和数量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	MEP百分比 (%)	MEP数量 ($\times 10^6$)
对照组 (0 d组)	30	0.71 ± 0.03	0.42 ± 0.02
脓毒症组			
1 d组	15	0.41 ± 0.05^a	0.17 ± 0.02^b
3 d组	15	0.23 ± 0.03^c	0.05 ± 0.01^d
7 d组	15	0.18 ± 0.03^e	0.10 ± 0.02^f

注: 与对照组相比, ^a: $t = 5.221$, $P < 0.0001$, ^b: $t = 8.097$, $P < 0.0001$, ^c: $t = 8.184$, $P < 0.0001$, ^d: $t = 11.21$, $P < 0.0001$, ^e: $t = 10.4$, $P < 0.0001$, ^f: $t = 10.33$, $P < 0.0001$

表2 各组小鼠脾脏中不同时间点MEP百分比和数量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	MEP百分比 (%)	MEP数量 ($\times 10^6$)
对照组 (0 d组)	0.020 ± 0.002	0.030 ± 0.003
脓毒症组		
1 d组	0.007 ± 0.003^a	0.006 ± 0.002^b
3 d组	0.007 ± 0.003^c	0.008 ± 0.004^d
7 d组	0.110 ± 0.030^e	0.270 ± 0.070^f

注: 与对照组相比, ^a: $t = 3.303$, $P = 0.002$, ^b: $t = 4.638$, $P < 0.0001$, ^c: $t = 3.134$, $P = 0.0034$, ^d: $t = 4.613$, $P < 0.0001$, ^e: $t = 5.17$, $P < 0.0001$, ^f: $t = 5.386$, $P < 0.0001$

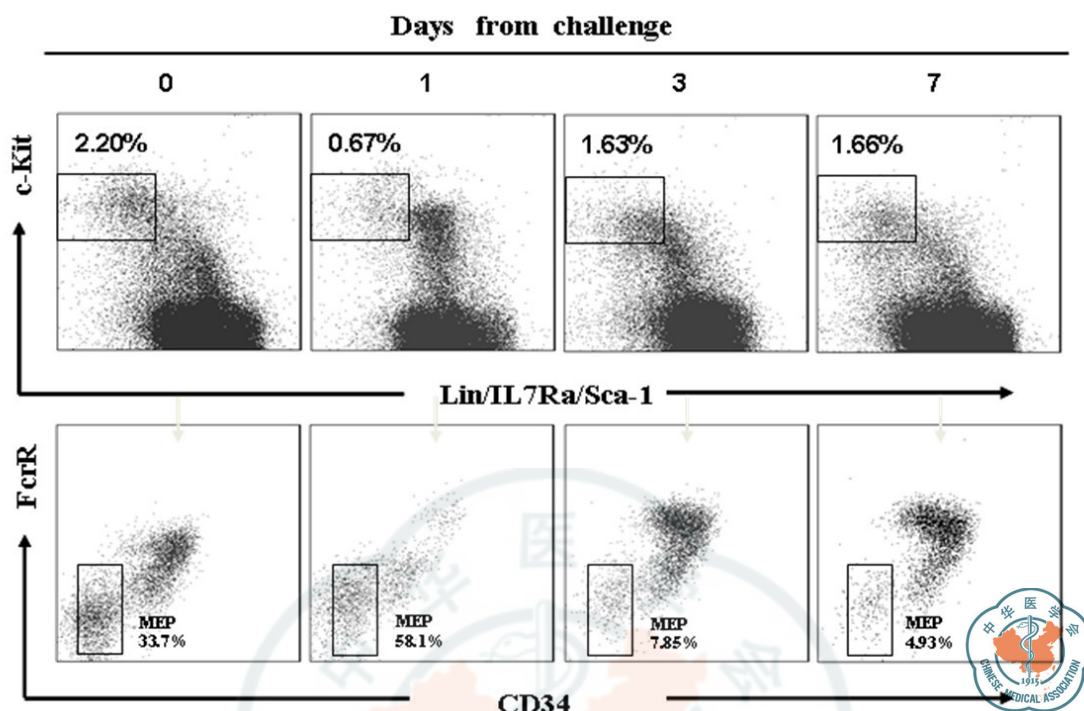


图1 CLP模型不同时间点骨髓MEP流式分析

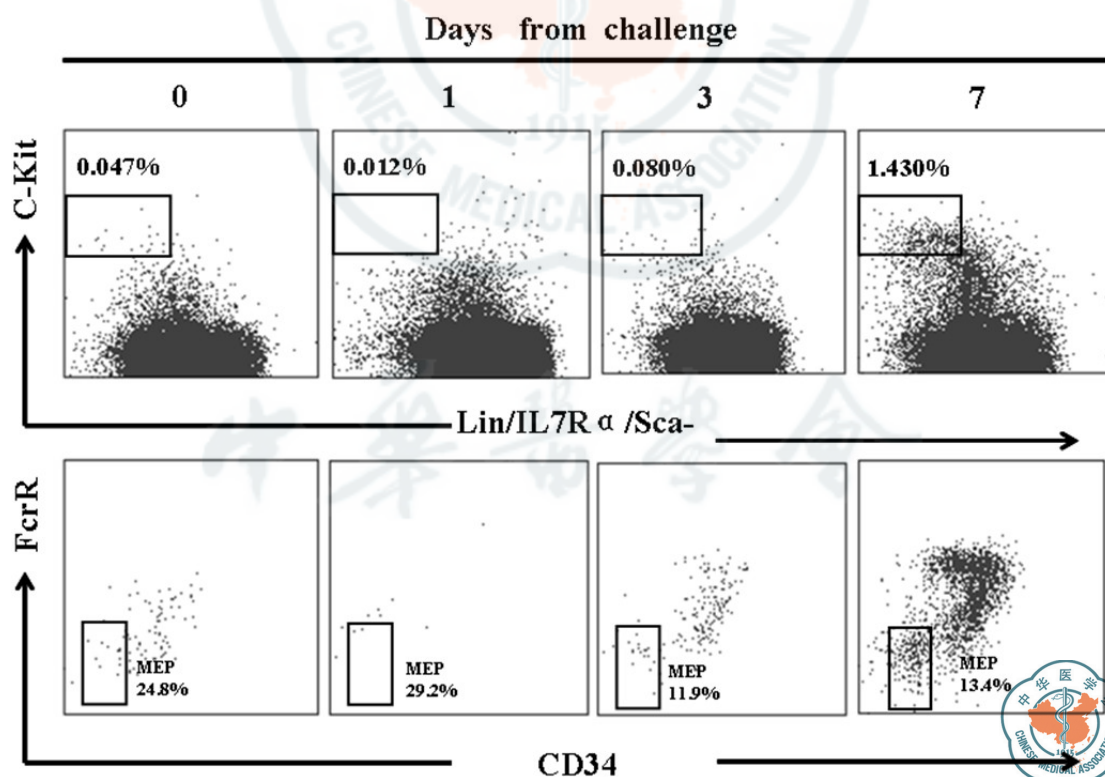


图2 CLP模型不同时间点脾脏MEP流式分析

患者血液中TNF- α 等炎性介质水平明显升高, 导致患者的铁代谢异常, 进而引起贫血的发生^[13-15]。但最近有研究认为, 脓毒症患者血红蛋白浓度和血清EPO浓度无直接关系, 在注射EPO治疗时脓毒症

患者对EPO的反应性降低^[16-17], 疗效并不显著。因此, 进一步研究脓毒症患者贫血的发病机制对临床治疗具有重要的指导意义。

新近研究表明, 在LPS诱导的小鼠脓毒症模型

中,贫血发生的原因是LPS在早期有核红细胞阶段抑制红细胞的生成以及加速抑制EPO在红细胞生成中的作用^[18]。而红细胞发育的更早期阶段是否受到影响尚未完全清楚,本研究发现CLP诱导的脓毒症小鼠模型中,术后第1 d时,具有红系定向分化功能的MEP细胞的比例显著降低;术后第3和7 d时,MEP比例持续下降,早期红系祖细胞的减少可能进一步引起红细胞发育下游阶段的细胞减少。提示在MEP阶段红细胞生成已经受到抑制。MEP下降的具体机制有待于进一步研究,推测可能与多种因素有关,如骨髓造血干细胞向红系分化受阻,MEP自身增殖能力降低或凋亡增加等。

正常情况下,红细胞的增殖分化发生在骨髓内。在机体处于压力环境下如感染、烧伤、肿瘤、创伤时,脾脏红细胞大量增加,也称为髓外红系造血。Jackson等^[19]报道沙门菌感染的小鼠脾脏肿大,脾脏红系细胞显著增多,大部分为不成熟的网状细胞。既往研究关于脓毒症对髓外早期红系祖细胞的影响报道较少。本研究发现,在CLP诱导的脓毒症发生早期,脾脏中MEP比例稍有下降,提示脾脏中红系造血亦受到抑制,具体机制可能与骨髓的红系造血抑制一致;而在脓毒症后期,脾脏中MEP比例显著增加,提示机体通过代偿性增加脾脏造血来补充骨髓红系造血不足。然而相对于骨髓生成红细胞的大量减少,髓外红细胞的生成并不能满足机体对红细胞的正常需要,这也可能是脓毒症时机体发生持续贫血的重要原因之一。

参 考 文 献

- Sakr Y, Lobo S, Knuepfer S, et al. Research anemia and blood transfusion in a surgical intensive care unit. *Critical Care*, 2010, 14(3):R92.
- Corwin HL, Gettinger A, Pearl RG, et al. The CRIT Study: anemia and blood transfusion in the critically ill-current clinical practice in the United States. *Crit Care Med*, 2004, 32(1):39-52.
- Nguyen BV, Bota DP, Melot C, et al. Time course of hemoglobin concentrations in nonbleeding intensive care unit patients. *Crit Care Med*, 2003, 31(2):406-410.
- Orkin SH, Weiss MJ. Apoptosis. Cutting red-cell production. *Nature*, 1999, 401(6752):433, 435-436.
- Akashi K, Traver D, Miyamoto T, et al. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*, 2000, 404(6774):193-197.
- Iwasaki H, Mizuno S, Mayfield R, et al. Identification of eosinophil lineage-committed progenitors in the murine bone marrow. *J Exp Med*, 2005, 201(12):1891-1897.
- Claessens YE, Fontenay M, Pene F, et al. Erythropoiesis abnormalities contribute to early-onset anemia in patients with septic shock. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006, 174(1):51-57.
- Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock: a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res*, 1980, 29(2):189-201.
- Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, et al. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat Protoc*, 2009, 4(1):31-36.
- Akashi K, Traver D, Miyamoto T, et al. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*, 2000, 404(6774):193-197.
- Stubbs JR. Alternatives to blood product transfusion in the critically ill: erythropoietin. *Crit Care Med*, 2006, 34(5 Suppl):S160-S169.
- Navarro JF, Mora-Fernández C, Hoffmann G, et al. Erythropoietin response is blunted in critically ill patients. *Intensive Care Med*, 1997, 23(8):920-921.
- Garcia PC, Longhi F, Branco RG, et al. Ferritin levels in children with severe sepsis and septic shock. *Acta Paediatr*, 2007, 96(12):1829-1831.
- Brendt P, Horwat A, Schafer ST, et al. Lipopolysaccharide evokes resistance to erythropoiesis induced by the long-acting erythropoietin analogue darbepoetin alfa in rats. *Anesthesia and Analgesia*, 2009, 109(3):705-711.
- van Iperen CE, Gaillard CA, Kraaijenhagen RJ, et al. Response of erythropoiesis and iron metabolism to recombinant human erythropoietin in intensive care unit patients. *Crit Care Med*, 2000, 28(8):2773-2778.
- Tseng MY, Hutchinson PJ, Kirkpatrick PJ. Interaction of neurovascular protection of erythropoietin with age, sepsis, and statin therapy following aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurgery*, 2010, 112(6):1235-1239.
- Nissenson AR, Dylan ML, Griffiths RI, et al. Septicemia in patients with ESRD is associated with decreased hematocrit and increased use of erythropoietin. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2006, 1(3):505-510.
- Brendt P, Rehfeld I, Kamphausen A, et al. Lipopolysaccharide interference in erythropoiesis in mice. *Anaesthesia*, 2012, 67(5):493-500.
- Jackson A, Nanton MR, O'Donnell H, et al. Innate immune activation during Salmonella infection initiates extramedullary erythropoiesis and splenomegaly. *J Immunol*, 2010, 185(10):6198-6204.

(收稿日期: 2013-01-11)

(本文编辑: 孙荣华)