

· 基础论著 ·

小鼠腹腔持续置管引流模型骨髓髓系造血受抑制的研究

孔雅娴 栗雅杰 马雅奎 缪鹏 曾辉

【摘要】目的 利用小鼠腹腔持续置管引流(CASP)模型探讨脓毒症对造血干细胞、髓系祖细胞的影响。**方法** 采用腹腔持续置管引流手术制作脓毒症小鼠模型,以假手术组作为对照。术后24 h,采用流式细胞术检测骨髓中造血干细胞、髓系祖细胞比例的变化以及造血干细胞增殖的变化。**结果** 与假手术组相比,CASP模型组以髓系细胞为主的骨髓总细胞数显著降低,骨髓造血干细胞(HSCs)扩增明显,多潜能祖细胞(MPPs)、共同髓系祖细胞(CMPs)和粒细胞-单核细胞祖细胞(GMPs)均显著减少。**结论** CASP脓毒症模型小鼠髓系细胞减少可能与骨髓造血干细胞髓系分化障碍有关。

【关键词】 腹腔持续置管引流;脓毒症;应急造血;造血干祖细胞;分化障碍

Study on suppression of myeloid hematopoiesis in mice challenged with colon ascendens stent peritonitis KONG Yaxian*, LI Yajie, MA Yaluan, MIAO Peng, ZENG Hui. *Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China; *Beijing Key Laboratory of Emerging Infectious Diseases, Beijing 100015, China

Corresponding author: ZENG Hui, Email: zenghui@ccmu.edu.cn

【Abstract】Objective To investigate the effects of sepsis on hematopoietic stem cells (HSCs) and myeloid progenitors with mouse model which received colon ascendens stent peritonitis (CASP). **Methods** The mouse model of sepsis was established by CASP surgery and sham operated mice were taken as control group. The proportions of HSCs and myeloid progenitors in bone marrow (BM) and the proliferation proportion of HSCs were analyzed with flow cytometer, 24 hours after the operation. **Results** Compared with the mice in sham group, the number of total BM cells, which mainly included myeloid cells, significantly decreased in CASP group. In addition, an expansion of septic BM HSCs was observed, whereas multipotent progenitors (MPPs), common myeloid progenitors (CMPs) and granulocyte/monocyte progenitors (GMPs) significantly reduced. **Conclusions** The reduction of myeloid cells from CASP mouse model is related to block of myeloid differentiation in BM HSCs.

【Key words】 Colon ascendens stent peritonitis; Sepsis; Emergency hematopoiesis; Hematopoietic stem and progenitor cell; Block of differentiation

脓毒症是由感染引起的全身免疫系统炎症反应。严重脓毒症和脓毒性休克病死率高达30%~70%,是重症监护病房常见的危重症和主要死亡原因之一^[1]。天然免疫系统功能的失活,导致感染难以控制,是脓症患者死亡的重要原因^[2]。天然免疫细胞大多处于有丝分裂后期,增殖能力有限,需要不断由骨髓造血干细胞和髓系祖细胞补充。近年

来研究表明,感染、手术、外伤以及肿瘤等应激状态下,炎症反应引发造血系统一系列急剧反应,以应对机体免疫应答的需要,这一过程被称为“应急造血”^[3]。进一步研究发现,脓毒症导致髓系造血过程异常,但在不同的模型中结果并不一致^[4-5]。因此,需要应用一种经典的脓毒症模型进行应急造血的研究。

腹腔感染为脓症患者最常见的感染,因此腹腔感染模型是目前最常用的脓毒症动物模型^[6]。小鼠腹腔持续置管引流(colon ascendens stent peritonitis, CASP)是脓毒症研究常用实验室模型之一,此模型模拟临床上肠痿的发病过程,重现了多菌群感染的腹腔脓毒症的病理生理变化,并最终导致全身炎症

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2014.04.001

基金项目:国家自然科学基金(No. 81101251; No. 81372095)

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(孔雅娴、栗雅杰、曾辉);中国中医科学院中医基础理论研究所(马雅奎);首都医科大学附属北京同仁医院普通外科(缪鹏)

通讯作者:曾辉, Email: zenghui@ccmu.edu.cn

反应^[6-7]。与另一种更为常用模型盲肠结扎穿孔相比, CASP 模型全身系统性感染程度、稳定性和标准化程度均要高于前者^[6,8]。因此, 本研究旨在应用 CASP 模型, 研究脓毒症对造血干、祖细胞数量及其功能的影响, 为脓毒症患者解除“免疫麻痹”的研究提供新思路。

材料和方法

一、实验动物

SPF 级 C57BL/6 小鼠, 雄性, 鼠龄 6~8 周, 来自中国医学科学院动物研究所。实验动物均饲养于中国医学科学院动物研究所动物中心, SPF 级。动物许可证号: SCXK(京)2009-0007。

二、试剂和材料

抗小鼠 CD127-Biotin、抗小鼠 CD34-FITC、抗小鼠 CD16/32-PE、抗小鼠 Flt3-PE、抗小鼠 Biotin Mouse Lineage Panel、抗人/小鼠 Ki-67-PE 试剂盒、静脉留置针均购自美国 BD 公司; 抗小鼠 Scal-1-Biotin、抗小鼠 Scal-1-FITC、FITC Annexin V 试剂盒均购自 Biolegend 公司。

三、实验方法

1. CASP 脓毒症动物模型的建立: 步骤参考 Zantl 等^[9-10]报道, 取小鼠腹中线切口, 暴露升结肠并将盲肠内的粪便挤入升结肠中以便穿刺, 在距回盲部 10 mm 升结肠系膜对侧处插入静脉留置针(18 G), 待穿透肠壁有落空感后缓慢退出针芯, 用 8/0 聚丙烯缝线缝合固定留置针管于 1 mm 刻痕处(术前做好刻痕)。在 3 mm 刻痕处剪断留置管, 挤出少许肠内容物并确认留置管无移位, 还纳升结肠并逐层关腹。术毕皮下注射 1 ml 生理盐水。假手术组将留置管平行固定于肠壁, 不进行穿刺, 其余步骤相同。

2. 制备小鼠骨髓单细胞悬液: 术后 24 h 处死小鼠, 分离小鼠的双股骨和胫骨, 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^[11]染色方法进行小鼠长期造血干细胞(long-term hematopoietic stem cell, LT-HSC)、短期造血干细胞(short-term HSC, ST-HSC)、多潜能祖细胞(multipotent progenitor, MPP)、共同髓系祖细胞(common myeloid progenitor cell, CMP)以及粒细胞-单核细胞前体细胞(granulocytic-macrophage progenitor cell, GMP)染色。其中 Mouse Lineage Panel 包括

抗-B220、抗-CD3、抗-CD11b、抗-Gr1和抗-Ter119。Annexin V 染色在表面标记物染色后, 采用 Annexin V 试剂盒按说明书进行染色。Ki-67 染色在表面标记物染色后, 按 Ki-67 试剂盒说明书进行染色。应用流式细胞仪(FACS Calibur, 美国 BD 公司)获取细胞, Flowjo 7.6 软件(美国 TreeStar 公司)处理数据, 分析 LSK 细胞(Lin⁻Sc-1⁺c-kit⁺)、LK 细胞(Lin⁻Sc-1⁻c-kit⁺)、LT-HSCs(Lin⁻Sc-1⁺c-kit⁺Flt3⁻)、ST-HSCs(Lin⁻Sc-1⁺c-kit⁺Flt3⁺)、MPPs(Lin⁻Sc-1⁺c-kit⁺Flt3^{hi})、CMPs[(Lin/Sca-1/CD127)^{low}c-Kit⁺CD34⁻CD16/32⁻]、GMPs[(Lin/Sca-1/CD127)^{low}c-Kit⁺CD34⁺CD16/32⁺]在骨髓中的比例。

四、统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计分析软件对数据进行分析。假手术组与 CASP 组的比较应用两独立样本 *t* 检验。以 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

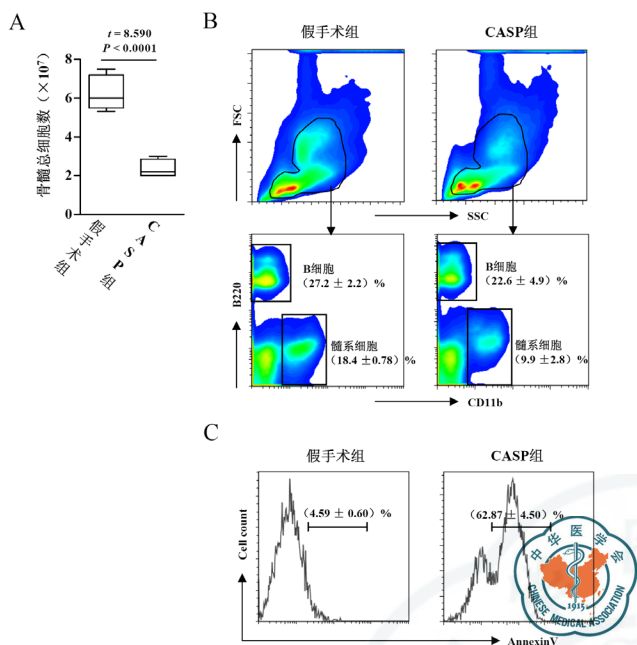
结 果

一、CASP 脓毒症引起骨髓总细胞数降低, 以髓系细胞为主

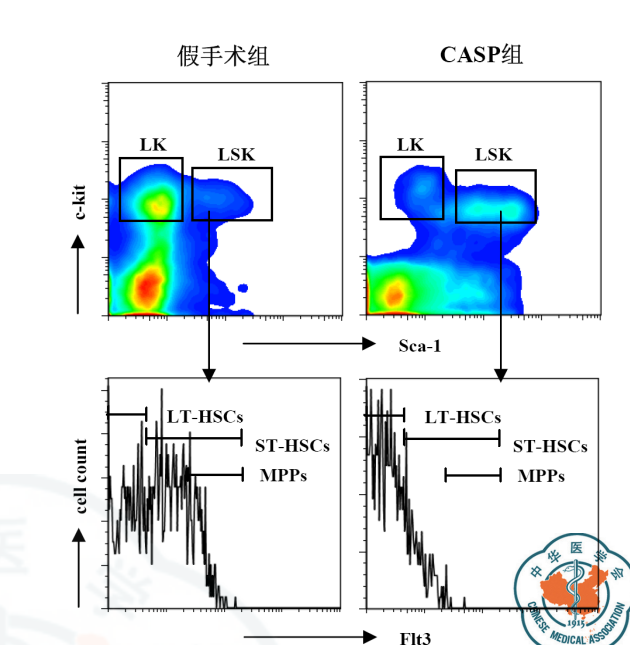
本研究成功建立 CASP 小鼠脓毒症模型, 采用 18 G 留置针, 96 h 内病死率为 30% (结果未显示), 与文献报道相似^[9-10]。与假手术组相比, CASP 模型小鼠术后 24 h 骨髓总细胞数从 $(6.08 \pm 1.02) \times 10^7$ 下降到 $(2.13 \pm 0.45) \times 10^7$ ($t = 8.590$, $P < 0.0001$) (图 1A)。流式细胞结果图显示, CASP 模型小鼠骨髓中 CD11b⁺ 的髓系细胞显著减少, 为骨髓总细胞数减少的主要原因(图 1B)。如图 1C 所示, Annexin V 检测发现 CASP 模型中髓系细胞凋亡比例显著增加, 从假手术组的 $(4.59 \pm 0.60) \%$ 增加至 CASP 组的 $(62.87 \pm 4.50) \%$ ($t = 22.23$, $P = 0.0020$), 提示脓毒症引起的髓系细胞大量凋亡, 可能是髓系细胞减少的原因之一。

二、CASP 脓毒症导致小鼠骨髓 LSK 细胞增多, LK 细胞减少

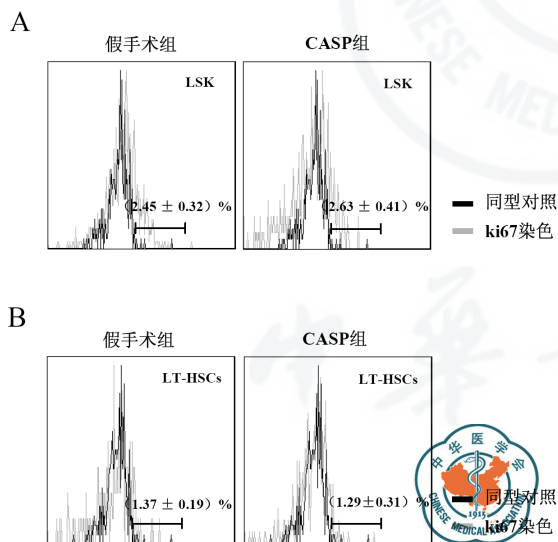
LSK 细胞为造血干、祖细胞的混合群体, 用 Flt3 可以将 LSK 细胞进一步分为 LT-HSCs、ST-HSCs、MPPs。结果显示, CASP 术后 24 h, LSK 细胞比例显著增加, 从假手术组 $(3.42 \pm 0.89) \%$ 增加至 CASP 模型组 $(6.53 \pm 1.04) \%$ ($t = 4.561$, $P = 0.0038$), 见表 1。Flt3 染色结果表明, LSK 细胞的 Flt3 表达显著降低, LT-HSCs 显著增多 ($t = 5.382$, $P = 0.0058$), ST-HSCs 无显著变



注: A: 假手术和CASP术后1 d, 小鼠体内骨髓总细胞计数;
B: 假手术和CASP术后1 d, 小鼠骨髓中B细胞和髓系细胞的比例;
C: 假手术和CASP术后1 d, 小鼠骨髓中髓系细胞的凋亡检测
图1 CASP脓毒症小鼠骨髓总细胞数、髓系细胞比例及凋亡的改变



注: 假手术及CASP术后1 d, 流式细胞术检测小鼠骨髓中LK细胞、LSK细胞、LT-HSCs、ST-HSCs和MPPs各亚群的比例
图2 CASP脓毒症小鼠骨髓造血干、祖细胞的流式检测



注: 假手术和CASP术后1 d, 流式细胞术检测骨髓LSK细胞(A)和LT-HSCs(B)的Ki-67表达情况

图3 CASP脓毒症小鼠骨髓造血干细胞的增殖检测

化 ($t = 0.857$, $P = 0.4399$), MPPs 显著减少 ($t = 5.712$, $P = 0.0047$), 提示CASPs脓毒症可能导致造血干细胞向下游多潜能祖细胞的分化障碍(表1)。与之相对应, LK细胞(Lin-Sca-1-c-kit⁺, 包含大部分髓系与红系祖细胞)显著减少, 从假手术组的(19.15 ± 1.84)%减少至CASPs模型

组的(6.18 ± 4.05)% ($t = 5.827$, $P = 0.0043$), 提示CASPs脓毒症可能导致造血干细胞向髓系祖细胞的分化障碍。

三、CASPs脓毒症小鼠骨髓LSK细胞和造血干细胞增殖能力无明显改变

为检测造血干祖细胞的增殖功能是否发生改变, 本研究分别对LSK细胞和LT-HSCs进行Ki-67染色。结果显示, CASPs模型小鼠的骨髓LSK细胞和LT-HSCs增殖能力均未发生显著改变。结果表明, LSK细胞尤其是LT-HSCs的增多并不依赖于其增殖能力的改变。

四、CASPs脓毒症导致骨髓髓系祖细胞CMPs和GMPs减少

体内的天然免疫细胞来源于骨髓髓系祖细胞的分化成熟。简而言之, MPPs继续向下分化为共同髓系祖细胞(CMPs), CMPs产生粒细胞巨噬细胞前体细胞(GMPs)并最终发育为粒细胞和单核巨噬细胞^[11]。流式细胞检测结果显示, CASPs模型小鼠CMPs、GMPs显著降低, 从假手术组的[CMP: (0.25 ± 0.09)%, GMP: (0.38 ± 0.02)%]减少至模型组的[CMP: (0.04 ± 0.01)%, GMP: (0.06 ± 0.01)%], 进一步证明脓毒症可能导致造血干细胞向髓系祖细胞的分化障碍, 表2。

讨 论

尽管脓毒症可由不同种类的病原微生物引发,但却表现出基本相同的异常免疫应答过程,主要为早期高炎症反应状态的全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)和随后发生的代偿性抗炎反应综合征(compensatory anti-inflammatory response syndrome, CARS)使机体转入低炎症反应状态。随着病情的发展,患者免疫系统由过度激活状态逐渐进入过度抑制状态,甚至发生“免疫麻痹”或“免疫无能”^[2]。此种情况一旦出现,不仅原发感染难以控制,继发多重感染的危险也会增加,导致患者病情恶化,甚至死亡。天然免疫细胞减少尤其是粒细胞缺乏症是造成这种免疫麻痹状况的主要原因之一^[12]。本研究应用经典的CASP小鼠腹腔脓毒症模型,主要阐述造血干、祖细胞的数量和功能的变化,探讨应急造血对免疫麻痹形成的影响。

本研究发现,CASP术后小鼠骨髓中造血干细胞(包括LT-HSCs和ST-HSCs)显著增多,下游髓系祖细胞(包括CMPs和GMPs)相反的显著减少;而增殖功能检测显示,CASP并未引起造血干祖细胞加快增殖,提示骨髓造血干细胞的增多现象可能是由于造血干细胞发生分化阻滞,尤其是髓系分化阻滞造成的。既往多项研究亦发现,在致死性脓毒症模型(如铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌和化脓性链球菌感染)中,骨髓的中性粒细胞急剧减少,导致感染无法控制最终机体死亡^[4,13]。Rodriguez等^[4]在铜绿假单胞菌感染烧伤模型小鼠中发现和本研究类似的结果,即骨髓LSK细胞大量增加,髓系祖细胞(CMPs和GMPs)却急剧减少。分化实验及转录因子检测进一步证实了分化阻滞导致这一现象的发生。然而,另外一些研究和本研究结果(数据未发表)发现,在CLP脓毒症模型小鼠和低剂量

LPS重复注射小鼠中,造血干细胞和髓系祖细胞均大量扩增,髓系分化加速,产生大量髓系细胞并释放入血发挥功能^[5]。造成这两种矛盾结果的原因可能为:实验中使用的CLP模型和低剂量LPS重复注射模型均为病死率低的轻症脓毒症模型,而本研究中运用的CASP模型和铜绿假单胞菌感染等致死性模型均为重症。重症脓毒症模型更容易进入免疫抑制期,轻症模型却有可能未进入这一危险期即已康复。因此,两类脓毒症模型发生发展过程中体内产生的炎症信号、细胞因子等均可能相异,对应急造血的影响也可能截然不同。

大量研究显示,感染导致造血干、祖细胞多种功能改变。体外和体内实验均证明,大肠埃希菌刺激造血干、祖细胞扩增和动员(人和小鼠)^[14]。同样的,病毒、念珠菌感染也能刺激LSK库扩增和活化。感染对造血干细胞、祖细胞的作用可能通过多种方式,如通过免疫系统产生的炎症信号(包括干扰素 α/β 、干扰素 γ 和肿瘤坏死因子 α 等),直接通过TLR信号,或者间接通过造血/非造血组织释放的细胞因子,包括粒细胞集落刺激因子(G-CSF),单核细胞集落刺激因子(M-CSF)和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF),以及早期作用的细胞因子如IL-3、IL-6和Flt3配体^[15]。本研究中,严重的脓毒症导致造血干细胞髓系分化阻滞是通过何种方式作用的,需要进一步深入探讨。

决定造血系统细胞分化发育的因素主要有胞外因素(如细胞因子、细胞间直接的相互作用、与胞外基质的相互作用)和胞内因素(如自身细胞因子受体信号肽或是转录分子的改变)^[11]。本研究发现,CASP脓毒症模型中感染引起造血干祖细胞髓系分化障碍,与Nagai等^[16]在体外的研究并不一致。后者证实,在LSK体外培养中加入LPS或Pam3CSK4可以促使其向髓系细胞分化。分析原因:

表1 CASP脓毒症小鼠骨髓造血干细胞、祖细胞的比例变化(%)

组别	只数	LSK 细胞	LK 细胞	LT-HSCs	ST-HSCs	MPPs
假手术组	9	3.42 ± 0.89	19.15 ± 1.84	1.18 ± 0.03	2.23 ± 0.02	0.98 ± 0.07
CASP 组	8	6.53 ± 1.04 ^a	6.18 ± 4.05 ^b	4.48 ± 0.08 ^c	2.05 ± 0.08 ^d	0.17 ± 0.02 ^e

注:与假手术组相比,^a: $t=4.561$, $P=0.0038$; ^b: $t=5.827$, $P=0.0043$; ^c: $t=5.382$, $P=0.0058$; ^d: $t=0.857$, $P=0.4399$; ^e: $t=5.712$, $P=0.0047$

表2 CASP脓毒症小鼠骨髓髓系祖细胞各亚群的比例变化(%)

组别	只数	CMPs	GMPs
假手术组	9	0.25 ± 0.09	0.38 ± 0.02
CASP 组	8	0.04 ± 0.01 ^a	0.06 ± 0.01 ^b

注:与假手术组相比,^a: $t=4.808$, $P=0.0171$; ^b: $t=22.625$, $P<0.0001$

体外培养体系缺乏体内的造血微环境。造血细胞的体内发育过程需要特定条件的微环境支持,脱离微环境所得出的结论无法反映造血发育的真实情况。此外,亦有研究表明,感染可以改变造血微环境和骨髓基质细胞的功能。因此,研究脓毒症对造血干祖细胞分化发育的影响,不可避免需要考虑到其对造血微环境及各种必需的外源性信号的影响。

参考文献

- 1 Riedemann NC, Guo RF, Ward PA. Novel strategies for the treatment of sepsis[J]. *Nat Med*,2003,9(5):517-524.
- 2 Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy[J]. *Nat Rev Immunol*,2013,13(12):862-874.
- 3 Zhang H, Nguyen-Jackson H, Panopoulos AD, et al. STAT3 controls myeloid progenitor growth during emergency granulopoiesis[J]. *Blood*,2010,116(14):2462-2471.
- 4 Rodriguez S, Chora A, Goumnerov B, et al. Dysfunctional expansion of hematopoietic stem cells and block of myeloid differentiation in lethal sepsis[J]. *Blood*,2009,114(19):4064-4076.
- 5 Scumpia PO, Kelly-Scumpia KM, Delano MJ, et al. Cutting edge: bacterial infection induces hematopoietic stem and progenitor cell expansion in the absence of TLR signaling[J]. *J Immunol*,2010,184(5):2247-2251.
- 6 Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M. Animal models of sepsis: setting the stage[J]. *Nat Rev Drug Discov*,2005,4(10):854-865.
- 7 Lustig MK, Bac VH, Pavlovic D, et al. Colon ascendens stent peritonitis--a model of sepsis adopted to the rat: physiological, microcirculatory and laboratory changes[J]. *Shock*,2007,28(1):59-64.
- 8 缪鹏, 郁正亚. 脓毒症实验动物模型CLP与CASP进展[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版,2010,4(4):464-469.
- 9 Zantl N, Uebe A, Neumann B, et al. Essential role of gamma interferon in survival of colon ascendens stent peritonitis, a novel murine model of abdominal sepsis[J]. *Infect Immun*,1998,66(5):2300-2309.
- 10 缪鹏, 杜中涛, 曾辉, 等. 一种小鼠弥漫性腹膜炎致脓毒症模型的建立[J]. 中华实验外科杂志,2011,28(6):1002.
- 11 Laiosa CV, Stadtfeld M, Graf T. Determinants of lymphoid-myeloid lineage diversification[J]. *Annu Rev Immunol*,2006,24:705-738.
- 12 Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities[J]. *Nat Rev Immunol*,2006,6(3):173-182.
- 13 Navarini AA, Lang KS, Verschoor A, et al. Innate immune-induced depletion of bone marrow neutrophils aggravates systemic bacterial infections[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2009,106(17):7107-7112.
- 14 Zhang P, Nelson S, Bagby GJ, et al. The lineage-c-Kit⁺Sca-1⁺ cell response to *Escherichia coli* bacteremia in Balb/c mice[J]. *Stem Cells*,2008,26(7):1778-1786.
- 15 Baldridge MT, King KY, Goodell MA. Inflammatory signals regulate hematopoietic stem cells[J]. *Trends Immunol*,2011,32(2):57-65.
- 16 Nagai Y, Garrett KP, Ohta S, et al. Toll-like receptors on hematopoietic progenitor cells stimulate innate immune system replenishment[J]. *Immunity*,2006,24(6):801-812.

(收稿日期: 2014-04-24)

(本文编辑: 孙荣华)

孔雅娴, 栗雅杰, 马雅奎, 等. 小鼠腹腔持续置管引流模型骨髓髓系造血受抑制的研究[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2014, 8(4): 453-457.

中华医学会