

## · 早期脏器损害 ·

# 烧伤血清对骨髓红系及粒系造血功能影响的实验研究

周燕虹 罗成基 郭朝华 孔佩艳 邹仲敏

**【摘要】** 目的 观察烧伤血清对正常小鼠骨髓红系、粒系造血功能的影响,初步探讨其可能的机制。方法 常规制备小鼠骨髓细胞(BMC),用其分别建立红系集落形成单位(CFU-E)培养体系和粒-单核细胞集落形成单位(CFU-GM)培养体系。在两体系中均加入 15% TBSA Ⅲ度烧伤小鼠伤后 12 h 及 1、3、5、7、10 d 的血清(烧伤血清组)和小鼠正常血清(正常血清组),另设阳性对照组和空白对照组,检测各血清对两培养体系的刺激活性。用放射免疫法检测烧伤血清中红细胞生成素(EPO)和粒-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)浓度的变化,并将此二指标分别与烧伤血清对 CFU-E、CFU-GM 培养体系的刺激活性作对数线性拟合相关分析。结果 (1)烧伤血清对 CFU-E、CFU-GM 培养体系的刺激活性明显升高,均在伤后 1 d 达峰值[(384 ± 60)、(127 ± 16) CFU]( $P < 0.01$ ),此后逐渐下降,到伤后 7 d[(125 ± 14)、(34 ± 20) CFU]接近正常血清组水平( $P > 0.05$ )。(2)烧伤血清中 EPO 浓度在伤后 12 h—7 d 较正常值显著升高( $P < 0.01$ ); GM-CSF 浓度在伤后 12 h、1 d 显著高于正常值( $P < 0.05$ )。(3)烧伤血清 EPO 浓度与烧伤血清对 CFU-E 培养体系的刺激活性呈显著对数正相关( $r = 0.8570$ ,  $P = 0.0137$ ); GM-CSF 浓度与烧伤血清对 CFU-GM 培养体系的刺激活性无显著相关性( $r = 0.7049$ ,  $P > 0.05$ )。结论 小鼠烧伤后早期的血清对骨髓红系、粒系刺激活性较强,其中 EPO 水平增高是烧伤血清对骨髓红系刺激活性较强的重要原因,GM-CSF 水平增高可能与烧伤血清对粒系刺激活性较强无关。

**【关键词】** 骨髓细胞; 红系祖细胞; 粒-单系祖细胞; 烧伤血清; 造血调控

The effects of burn serum on the erythropoiesis and granulopoiesis in bone marrow in mice ZHOU Yan-hong, LUO Cheng-ji, GUO Zhao-hua, KONG Pei-yan, ZOU Zhong-min. State key laboratory of Trauma, Burns and combined Injury, Institute of Combined Injury, The Third Military Medical University, Chongqing 400038, P. R. China

Corresponding author: LUO cheng-ji, Email: Luo chengji@mail.tmmu.com.cn, Tel: 023-68752281

**【Abstract】** Objective To observe the effects of burn serum on the erythropoiesis and granulopoiesis in bone marrow in mice, and to explore the possible underlying mechanism. Methods Murine bone marrow cell (BMC) strain was prepared routinely and was employed in the establishment of the culture system of colony forming units of erythrocytes, or granulocytes and monocytes. To both sets of culture system normal murine serum (N group) and burn serum, which was collected from the mice with 15% full thickness burn at 12 postburn hours (PBH) and 1, 3, 5, 7 and 10 postburn days (PBD), (burn serum group) was added. In addition, positive control and blank control groups were set accordingly. The stimulating activity of all kinds of sera on the BMCs in the two sets of culture system was determined. The changes in the burn serum concentrations of EPO and GM-CSF were detected by radioimmunoassay, and the data were analyzed by logarithmic linear fitting correlation with the former influence of burn sera on the erythrocytes and granulocytes. Results (1) Burn sera exhibited obvious stimulation promoting activity on the erythropoiesis and granulopoiesis in BMC, and the activity peaked (384 ± 60 and 127 ± 16 CFU) on 1 PBD and decreased thereafter to approach the values found in normal sera group (125 ± 14 and 34 ± 20 CFU) on 7 PBD. (2) The EPO content in burn serum was evidently higher than the normal value ( $P < 0.01$ ) during 12 PBH to 7PBD period. The GM-CSF concentration was obviously higher than the normal value ( $P < 0.05$ ) at 12 PBH and on 1 PBD. (3) The EPO concentration in burn serum was significantly and logarithmically correlated with the stimulation promoting activity of burn serum on erythropoiesis ( $r = 0.8570$ ,  $P = 0.0137$ ). But the GM-CSF concentration in culture with burn serum was not correlated with the stimulation promoting activity of burn serum on granulopoiesis ( $r = 0.7049$ ,  $P > 0.05$ ). Conclusion The sera harvested from burned mice during early postburn stage exhibited strong stimulation promoting activity on the erythropoiesis and granulopoiesis in bone marrow. The increased EPO level in burn serum might be the important factor contributing strong stimulation action on erythro-

基金项目:全军“九五”医药卫生攻关课题资助项目(96L045)

作者单位:400038 重庆,第三军医大学全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室(周燕虹现在卫生毒理学教研室)

通信(讯)作者:罗成基, Email:luochengji@mail.tmmu.com.cn, 电话:023-68752281

poiesis, while increased GM-CSF level was not.

【Key words】 Bone marrow cells; Erythroid progenitor cells; Granulocyte/Macrophage-colony progenitor cells; Burn serum; Hematopoietic modulation

烧伤所致的造血系统变化是烧伤的重要病理生理反应之一。烧伤后红系、粒系造血功能改变与受伤严重程度有关,同时与伤后感染及免疫功能联系紧密,直接影响病程的转归和预后。但是关于机体烧伤后红系、粒系造血功能的改变情况及其发生机制,目前知之甚少。本文通过研究烧伤血清对正常小鼠骨髓红系、粒系造血功能的影响,并分别观察血清中红细胞生成素(EPO)和粒-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)水平的变化,以探讨机体烧伤后造血功能改变的机制。

## 材 料 与 方 法

### 一、动物来源及主要试剂

80 只 7~8 周龄的雄性昆明小鼠,体重 20~24 g,由第三军医大学实验动物中心提供。RPMI 1640 培养基、小牛血清购自美国 Gibco 公司,马血清购自北京放射医学研究所,10 U/ml EPO 购自日本麒麟公司,甲基纤维素、谷氨酰胺、 $\beta$  巯基乙醇购自美国 Sigma 公司, $^{131}\text{I}$  标记的 EPO 和 GM-CSF 放射免疫试剂盒由北京东亚免疫技术研究所提供。肌浸液(集落条件培养液)参照文献[1]的方法自制。

### 二、小鼠骨髓细胞(BMC)及血清的制备

1. BMC 的制备:取 10 只小鼠,无菌条件下剥离其股骨后,用 RPMI 1640 培养基冲洗股骨,收集冲洗液,经 4 号注射针头过滤获得 BMC。

2. 烧伤血清及正常血清的制备:(1)取 60 只小鼠,背部去毛后,以 30 g/L 凝固汽油均匀涂抹该处,点火燃烧 7 s,制成 15% TBSA Ⅲ度烧伤模型(经病理切片证实)。伤后 12 h 及 1、3、5、7、10 d 经股动脉无菌采血(每时相点 10 只),常规方法制备烧伤血清,4℃ 保存。(2)取 10 只正常小鼠,常规制备正常血清。(3)每只小鼠血清制备量  $\geq 1$  ml,制取后及时进行相应检测,以免其活性降解。

### 三、实验分组及检测指标

本实验分红系集落形成单位(CFU-E)培养体系和粒-单核细胞集落形成单位(CFU-GM)培养体系。

1. CFU-E 培养体系及各血清对其刺激活性的检测:(1)体系基础成分为  $1 \times 10^{-4}$  mol/L  $\beta$  巯基乙醇 0.2 ml、27 g/L 甲基纤维素 0.7 ml、30 g/L 谷氨酰胺 0.03 ml、马血清 0.7 ml、BMC 终密度  $2.5 \times 10^5$ /ml。在上述基础成分中,分别加入正常血清 0.2 ml(正

常血清组);伤后各时相点的烧伤血清各 0.2 ml(烧伤血清组);10 U/ml 的 EPO 0.2 ml(阳性对照组);RPMI 1640 培养液 0.2 ml(空白对照组)。最后加入适量 RPMI 1640 培养液,将各体系的总体积补足为 2 ml。(2)将各体系混匀后,加至 96 孔培养板中,0.2 ml/孔,放入 37℃、体积分数 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中。7 d 后于显微镜下观察,8 个以上细胞组成的暗黄色或桔红色集落即为 1 个 CFU-E。计算 CFU-E 集落数,以之代表血清对红系的刺激活性。

2. CFU-GM 培养体系及各血清对其刺激活性的检测:(1)体系基础成分为马血清 1.2 ml、BMC 终密度  $1 \times 10^5$ /ml、27 g/L 甲基纤维素 1.4 ml。在上述基础成分中,分别加入正常血清 0.5 ml(正常血清组);伤后各时相点的烧伤血清各 0.5 ml(烧伤血清组);肌浸液 0.5 ml(阳性对照组);RPMI 1640 培养液 0.5 ml(空白对照组)。各体系最后用 RPMI 1640 培养液补足到 4 ml。(2)混匀各体系后分别加至 24 孔培养板中,1 ml/孔,置于 37℃、体积分数 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中。6 d 后于显微镜下观察,由 50 个以上细胞组成的集落即为 1 个 CFU-GM,以 CFU-GM 的集落数代表血清对粒系的刺激活性。

3. 血清中 EPO、GM-CSF 浓度的检测:采用  $^{131}\text{I}$  标记的 EPO 和 GM-CSF 放射免疫试剂盒,按说明书操作。

### 四、统计学处理

数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 2.3 统计软件进行基本统计、*t* 检验,并对烧伤血清中 EPO 的浓度与烧伤血清对红系的刺激活性、烧伤血清 GM-CSF 的浓度与烧伤血清对粒系的刺激活性作对数线性拟合相关分析。

## 结 果

1. 各血清对红系的刺激活性:烧伤血清组伤后早期(伤后 12 h)即有很强的红系刺激活性,1 d 时达到高峰,第 3 天和第 5 天虽然有所下降,仍明显高于正常血清组( $P < 0.01$ ),第 7 天后恢复至正常血清组水平。烧伤后 12 h 和 1、3 d 的血清红系刺激活性均明显高于阳性对照(EPO)组,同时期正常血清组的刺激活性却低于阳性对照组( $P < 0.01$ )。见表 1。

2. 各血清对粒系的刺激活性:与空白对照组比较,烧伤血清组除伤后 5、7 d 外,其余各时相点的粒系刺激活性明显偏高( $P < 0.05$  或 0.01)。烧伤血

清组伤后 12 h 粒系刺激活性即显著高于正常血清组 ( $P < 0.01$ ), 伤后 1 d 达到高峰, 此时亦高于阳性对照(肌浸液)组 ( $P < 0.05$ ); 3 d 时其刺激活性已不及阳性对照组 ( $P < 0.01$ ), 但仍高于正常血清组 ( $P < 0.01$ ); 第 5、7 天接近空白对照组水平 ( $P > 0.05$ ), 第 10 天接近正常血清组水平, 但仍低于阳性对照组 ( $P < 0.01$ )。见表 2。

3. 烧伤血清 EPO、GM-CSF 浓度的动态变化: 烧伤血清 EPO 浓度在伤后 12 h—7 d 均显著高于正常值 ( $P < 0.01$ ), 12 h 为高峰; GM-CSF 浓度在伤后 12 h、1 d 显著高于正常值 ( $P < 0.05$ ), 此后基本恢复正常。见表 3。

4. 相关性分析: (1) 烧伤血清 EPO 浓度与烧伤血清对红系的刺激活性呈显著对数正相关, 方程式为  $\ln(Y-90) = 7.903\ln X - 2.307$  ( $r = 0.8570$ ,  $P = 0.0137$ ), 其中 Y 为 CFU-E 克隆数, X 为 EPO 血清水平。(2) 烧伤血清中 GM-CSF 的浓度与烧伤血清对粒系的刺激活性无显著相关性 ( $r = 0.7049$ ,  $P > 0.05$ )。

讨 论

烧伤后红系、粒系造血功能的改变因烧伤面积及程度不同而各异。有文献报道, 烧伤可导致大量细胞因子在体液中的浓度发生改变, 包括粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、白细胞介素(IL)1、IL-6、肿瘤坏死因子(TNF) $\alpha$ 、前列腺素(PG) $E_2$ 等, 这将不同程度地影响机体烧伤后的造血功能<sup>[2]</sup>。

本研究结果显示, 小鼠烧伤后(尤其是早期)血清具有很强的红系造血刺激活性, 此间烧伤血清中的 EPO 水平明显高于正常值, 且两者呈对数正相关 ( $P < 0.05$ )。笔者认为烧伤后血清的红系造血刺激活性增高是机体对烧伤的应激反应之一, 其中血清 EPO 水平升高是红系刺激活性增强的重要因素之一。烧伤后血浆中儿茶酚胺增多、雄激素应激性分泌增强以及血红蛋白合成障碍所导致的低氧状态, 都可能促进了烧伤后血清 EPO 水平增强。尽管在烧伤后第 7 天血清 EPO 水平仍显著高于正常值, 但此时烧伤血清的红系刺激活性已回到正常水平,

表 1 各血清作用下 CFU-E 培养体系产生 CFU-E 的数量(CFU,  $\bar{x} \pm s$ )

Tab 1 The number of CFU-E formed in CFU-E culture system under the influence of different sera(CFU,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本数 (个)	伤后时间					
		12 h	1 d	3 d	5 d	7 d	10 d
正常血清组	10	89 ± 28* $\Delta$	84 ± 17* $\Delta$	94 ± 33* $\Delta$	84 ± 22* $\Delta$	107 ± 20* $\Delta$	93 ± 22* $\Delta$
阳性对照组	10	211 ± 17	217 ± 13	226 ± 17	202 ± 24	186 ± 11	203 ± 25
空白对照组	10	16 ± 3	18 ± 4	17 ± 3	19 ± 3	22 ± 6	17 ± 3
烧伤血清组	10	316 ± 15** $\Delta$	384 ± 60** $\Delta$	286 ± 13** $\Delta$	177 ± 41**	125 ± 14* $\Delta$	90 ± 22* $\Delta$
烧伤血清组: 正常血清组		3.53	4.56	3.06	2.11	1.16	0.97
烧伤血清组: 空白对照组		1.26	1.77	1.26	0.88	0.66	0.44

注: 为避免批间差异, 在烧伤血清组伤后各时相点下, 均同时检测了前三组的 CFU-E 数量; 与正常血清组比较, \*  $P < 0.01$ ; 与空白对照组比较, #  $P < 0.01$ ; 与阳性对照(EPO)组比较,  $\Delta P < 0.01$

表 2 各血清作用下 CFU-GM 培养体系产生 CFU-GM 的数量(CFU,  $\bar{x} \pm s$ )

Tab 2 The number of CFU-GM formed in CFU-GM culture system under the influence of different sera(CFU,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本数 (个)	伤后时间					
		12 h	1 d	3 d	5 d	7 d	10 d
正常血清组	10	24 ± 5*	18 ± 12*	44 ± 17 $\Delta$ *	51 ± 15 $\Delta$ *	51 ± 4 $\Delta$ *	59 ± 6 $\Delta$ *
阳性对照组	10	86 ± 10	96 ± 48	154 ± 12	69 ± 6	88 ± 8	86 ± 4
空白对照组	10	19 ± 3	19 ± 3	18 ± 5	22 ± 4	22 ± 4	20 ± 3
烧伤血清组	10	91 ± 10**	127 ± 16** $\Delta$	80 ± 5** $\Delta$	23 ± 5**	34 ± 20*	58 ± 8 $\Delta$ *
烧伤血清组: 正常血清组		3.76	7.21	1.82	0.44	0.66	0.98
烧伤血清组: 空白对照组		1.07	1.32	0.52	0.33	0.38	0.67

注: 为避免批间差异, 在烧伤血清组伤后各时相点下, 均同时检测了前三组的 CFU-GM 数量; 与正常血清组比较, \*  $P < 0.05$ , #  $P < 0.01$ ; 与空白对照组比较,  $\Delta P < 0.05$ ,  $\star P < 0.01$ ; 与阳性对照(肌浸液)组比较,  $\blacktriangle P < 0.05$ ,  $\star P < 0.01$

表 3 小鼠烧伤血清中 EPO、GM-CSF 的浓度变化( $\mu\text{g/L}$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

Tab 3 Changes in the contents of EPO and GM-CSF in the serum of burned mice( $\mu\text{g/L}$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

检测指标	正常值	伤后时间					
		12 h	1 d	3 d	5 d	7 d	10 d
EPO	1.44 ± 0.85	2.94 ± 0.17*	2.42 ± 0.13*	2.01 ± 1.31*	2.07 ± 0.64*	2.67 ± 0.54*	1.29 ± 0.26
GM-CSF	0.190 ± 0.019	0.230 ± 0.058*	0.230 ± 0.017*	0.204 ± 0.013	0.210 ± 0.004	0.180 ± 0.017	0.170 ± 0.013

注: 各检测指标样本数均为 10; 与正常值比较, \*  $P < 0.05$ , #  $P < 0.01$

说明血清中还有其他抑制组分拮抗了 EPO 的促红系增殖作用。Wallener 等<sup>[3]</sup>曾从烧伤血清中提取了一种能抑制红系造血功能的酸性蛋白,该蛋白直接作用于红系祖细胞,而不是通过灭活或者干扰 EPO 间接作用于红系祖细胞,其相对分子质量为 1.43 ~ 290 000.00。这种抑制效应并非在伤后立即出现,而是逐渐出现,并且在伤后 20—30 d 达到最高水平。这与本研究结果吻合。另一方面,烧伤后虽然血清 EPO 水平升高,但是其升高倍数远不及血清对红系刺激活性提高的倍数,提示除了 EPO 升高外,可能还有其他因素参与了红系的造血调控,对此有必要进一步研究。

粒-巨噬细胞的产生是一个受到高度调控的过程,涉及粒系特异性细胞定向生长和复杂调节因子的相互作用,受多种细胞因子的调节,包括 GM-CSF、G-CSF、单核细胞集落刺激因子(M-CSF)、IL-3 和 IL-4 等,其中相当一部分刺激因子是单核-巨噬细胞的产物。在一系列调控过程中,单核-巨噬细胞产物(包括粒系增殖分化的正、负调控因子)是关键的控制因素,在严重烧伤或感染后,其水平发生显著改变。本实验观察到伤后早期血清 CSFs 样活性加强就是正、负双向调控的结果。伤后 24 h 内,血清 GM-CSF 水平升高,但升高的幅度远不及血清对粒系刺激活性升高的幅度。此外,血清 GM-CSF 水平与血清对粒系刺激活性无显著相关性,说明 GM-CSF 并不是粒系活性升高的主要原因,应该还有其他因素参与。Volchegorskii 等<sup>[4]</sup>认为,烧伤后血浆中的急性炎症介质参与了烧伤后的造血调控。他们从大狗烧伤血浆中分离得到相对分子质量为  $(0.5 \sim 1.5) \times 10^3$  的中分子蛋白,对骨髓造血调控有重要作用,能抑制红系而刺激粒系造血。但在本实验中,烧伤血清的红系造血刺激活性明显高于粒系,这可能与烧伤面积有关,烧伤面积越大,对红系的抑制较明显而对粒系的刺激相对增强。Gamelli 等<sup>[5]</sup>采用酶联免疫吸附测定法检测了小鼠 15% TBSA III 度烧伤后骨髓、脾脏及血清中 G-CSF 的浓度,结果显示烧伤感染后脾脏和骨髓的 G-CSF 产量升高,血清中 G-CSF 的浓度是正常值的 14 倍。本研究结果中血

清的粒系造血刺激活性与血清中 GM-CSF 浓度不相关,提示血清粒系刺激活性增强可能与血清中其他刺激粒系造血的因子水平升高有关。此外,烧伤应激时产生的神经肽 P 物质(SP)也可能参与了粒系造血调控。有实验证明 SP 不仅可以刺激骨髓细胞产生 GM-CSF,还能直接或协同参与粒系造血<sup>[6]</sup>。Moore 等<sup>[7]</sup>在体外培养 BMC 的实验中观察到,SP 可作为协同刺激物增强 M-CSF 作用下的增殖反应。SP 还可作为惟一的外源性因子,有效地刺激体外培养的人骨髓红系、粒系祖细胞生长<sup>[8]</sup>。而急性期烧伤血清中的粒系造血活性刺激物质是否就是 SP,尚需进一步证实。

尽管机体烧伤后其 EPO 和 CSF 水平应激性地增高,但仍不足以代偿烧伤对骨髓造血干/祖细胞的抑制作用,故出现烧伤后骨髓造血功能下降,临床上表现为贫血、免疫功能低下等。外源性地给予患者 EPO 和 GM-CSF,不一定能扭转这种局面,因此积极研究烧伤后机体的造血调控机制,将有助于改善烧伤患者的免疫和造血功能。

#### 参 考 文 献

- 1 杨景山,葛忠良,主编. 医学细胞化学与细胞生物技术. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1992. 305-315.
- 2 Struzyna J, Pajda Z, Braun B, et al. Serum cytokine levels (IL-4, IL-8, IL-6, G-CSF, GM-CSF) in burned patients. *Burns*, 1995, 21: 427-440.
- 3 Wallener SF, Vantrin R, Kat Z, et al. The anemia of thermal injury: partial characterization of an erythroid inhibitory substance. *J Trauma*, 1987, 27: 639-645.
- 4 Volchegorskii IA, Tishevskaja NV, Kuznetsov DA. Effects of medium-weight molecules isolated from plasma of healthy and burnt animals on the cellular composition of cultured bone marrow erythroblastic islets. *Vestn Ross Akad Med Nauk*, 2002, 2: 30-36.
- 5 Gamelli R, He LK, Hahn E. Granulocyte colony-stimulating factor: release is not impaired after burn wound infection. *J Trauma*, 2002, 53: 284-289.
- 6 Agro A, Stanisz AM. Are lymphocytes a target for substance P modulation in arthritis? *Semin Arthritis Rheum*, 1992, 21: 252-258.
- 7 Moore RN, Osmand AP, Dunn JA, et al. Substance P augmentation of CSF-1-stimulated in vitro myelopoiesis. A two-signal progenitor restricted, tuftsin-like effect. *J Immunol*, 1988, 141: 2699-2703.
- 8 Rameshwar P, Ganea D, Gascon P. In vitro stimulatory effect of substance P on hematopoiesis. *Blood*, 1993, 81: 391-398.

(收稿日期:2004-12-24)

(本文编辑:罗勤)

#### 读者·作者·编者

#### 本刊关于“特定起点与终点定界时间段”表示的要求

根据 GB/T7408-94《数据元和交换格式信息交换日期和时间表示法》,由特定起点与终点定界的时间段的表示,起点与终点之间以一字线为分隔符,而不再用波纹线。示例如下:2001—2004 年,而不再表示为 2001~2004 年。注意:除上述时间段之外的其他计数、计量范围的表示,仍然用波纹线“~”表示,如 2~8 kg。