DOI:10.16016/j.2097-0927.202308043

# 过度劳累对小鼠脾脏造血功能的影响

邓三春[1],陈苏衡[1],于恺华[1],郭 鸿[1],廖 阅[1],鲍振星[1],李玉兰[2] 730000 兰州,兰州大学:第一临床医学院[1],第一医院麻醉科[2]

[摘要] **目的** 探讨过度劳累(过劳)对小鼠脾脏造血功能的影响。**方法** C57BL/6J 小鼠 18 只,按随机数字表法分为 3 组($n$=6):对照(C)组、过劳 15 d (W1) 组、过劳 30 d(W2)组。W1、W2 组每日强迫水中站立 8 h+束缚 3 h,分别持续 15、30 d,C 组无特殊处理。观察测量小鼠一般情况、进食量和体质量,造模结束后取血、处死小鼠,分离脾脏和心脏,测量脾脏指数;检测血常规;脾脏行 HE 染色;采用 RT-qPCR 法检测小鼠脾脏趋化因子 CXC 配体 12(C-X-C motif chemokin ligand 12, CXCL12)、干细胞因子(stem cell factor, SCF)和心脏间隙连接蛋白 45(connexin 45,Cx45) mRNA 表达水平;采用 ELISA 检测脾脏 CXCL12、SCF 蛋白表达水平;免疫组化法行心脏 Cx45 蛋白定量。**结果** ①一般情况:与 C 组相比,W1 组、W2 组小鼠毛发粗糙,活跃程度先增加后下降,扎堆、精神状态差;小鼠进食量:W1、W2 组显著高于同时间 C 组;C 组小鼠体质量随喂养时间增加而增加,W1、W2 组体质量无明显增长;W2 组小鼠脾脏指数显著下降($P$<0.05);②血常规:与 C 组相比,W2 组 WBC、RBC 数目、HGB 浓度显著升高($P$<0.05);W1 组、W2 组 PLT 数目显著升高($P$<0.05);③脾脏 HE 染色:与 C 组相比,W2 组小鼠脾脏红髓与白髓分界欠清,红髓区域增大;④RT-qPCR 检测结果显示:W2 组心脏组织 Cx45 mRNA 表达显著高于 C 组($P$<0.05);脾脏组织 SCF mRNA 表达显著高于 C 组和 W1 组($P$<0.05);⑤免疫组化检测结果显示:W1 组和 W2 组小鼠心肌 Cx45 蛋白含量显著高于 C 组($P$<0.05);⑥ELISA 检测结果显示:W2 组脾脏组织 SCF 蛋白表达显著高于 C 组和 W1 组($P$<0.05),W1 组较 C 组差异无统计学意义。**结论** 过劳可破坏心肌细胞间的紧密连接,增强脾脏造血功能,使全血细胞数目过度增加,形成血液高凝状态,这可能是过劳死相关心血管疾病的诱发因素之一。

[关键词] 过度劳累;髓外造血;脾脏;心肌梗死
[中图法分类号] R331.21;R363.22; R873 [文献标志码] A

# Effect of overwork on hemopoietic function of spleen in mice

DENG Sanchun[1], CHEN Suheng[1], YU Kaihua[1], GUO Hong[1], LIAO Yue[1], BAO Zhenxing[1], LI Yulan[2] [1]The First Clinical Medical College, [2]Department of Anesthesiology, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu Province, 730000, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of overwork on the hemopoietic function of spleen in mice. **Methods** A total of 18 C57BL/6J mice were randomly divided into 3 groups, i.e., control group (C), 15-day-overworked group (W1) and 30-day-overworked group (W2). The mice from Groups W1 and W2 were forced to keep standing in water for 8 h and restrained for 3 h for consecutive 15 and 30 d, respectively, while those of Group C had no special treatment. The general condition, food intake and body weight of the mice were observed and measured. After modelling, the mice were euthanatized, and the spleen and heart were isolated to calculate spleen index and observe spleen pathological changes after HE staining, and then blood routine test was performed. The mRNA expression levels of CXCL12 and SCF in the spleen and that of connexin 45 (Cx45) in the heart were detected by RT-qPCR, and the protein levels of CXCL12 and SCF in spleen were detected by ELISA. The cardiac protein level of Cx45 was quantified with immunohistochemical assay. **Results** ① General condition showed that Groups W1 and W2 showed coarse

[基金项目] 甘肃省卫生健康行业科研项目(GSWSKY2021-079)
[通信作者] 李玉兰,E-mail: jasm@sina.com

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

hairs, increased at first and then decreased in activities, poor mental state, and larger food intake when compared with Group C. The body weight of Group C was increased with the feeding time, but that of Groups W1 and W2 had no such change. The spleen index was decreased significantly in Group W2 ($P<0.05$). ② The results of blood routine test showed that WBC and RBC counts and HGB level were significantly increased in Group W2($P<0.05$), and PLT count in Groups W1 and W2 was significantly increased compared with Group C ($P<0.05$). ③ Spleen HE staining displayed that the boundary between red pulp and white pulp was not clear, and the region of red pulp was enlarged in Group W2 when compared with Group C. ④ RT-qPCR showed that the mRNA level of Cx45 was significantly higher in heart tissue of Group W2 than that of Group C ($P<0.05$), and that of SCF in spleen tissue of Group W2 was also higher than that in Groups C and W1 ($P<0.05$). ⑤ Immunohistochemical assay indicated that the protein expression of Cx45 in myocardium of Groups W1 and W2 was significantly higher than that in Group C ($P<0.05$). ⑥ ELISA revealed that the content of SCF in the spleen of Group W2 was notably higher than that of Groups C and W1 ($P<0.05$), but there was no statistical difference between Groups W1 and C. **Conclusion** Overwork destroys the tight connection between cardiac myocytes, enhances the hemopoietic function of spleen, increases WBC count, and then forms a hypercoagulable state, which may be one of the precipitating factors for cardiovascular diseases related to overwork.

[**Key words**] overwork; extramedullary hematopoiesis; spleen; myocardial infarction

Supported by the Scientific Research Project for the Health Industry of Gansu Province (GSWSKY2021-079). Corresponding author: LI Yulan, E-mail: jasm@sina.com

随着现代社会高速发展,各行业科技进步日新月异。但科技的进步和工作效率的提高并没有让凯恩斯预言的“闲暇社会”如期出现,人们反而更加忙碌,这使过度劳累(过劳)成为严重的人类健康问题和社会问题。2019 年 WHO 将“过劳”列入《国际疾病分类》,明确过劳是指由于工作时间过长、劳动强度过大、心理压力过重导致精疲力竭的亚健康状态。研究表明,过劳是引发心脑血管疾病、精神障碍等一系列直接或间接致死的危险因素[1]。

近年来,国内外过劳死案例频发,心脑血管疾病如脑出血、脑梗死、心肌梗死等被认为是过劳死的主要原因[2]。已有研究探索过劳造成的心脏、大血管损伤如心肌梗死相关病理机制[3-5]。众所周知,慢性疲劳会降低机体免疫功能,导致机体对病原体易感[6],而过劳死是慢性疲劳综合征发展、恶化的结果[7]。在成年个体中脾脏主要发挥免疫功能,同时还具有吞噬病原体和衰老细胞、滤血、储血、造血等多方面的功能[8]。研究表明,感染和心肌梗死均会诱发脾脏髓外造血[9],出现造血功能代偿性增强或病理性增生。过劳是否会诱发脾脏髓外造血,目前尚不清楚。本研究建立小鼠过劳模型,研究过劳对小鼠外周血细胞计数、脾脏病理、造血相关指标的影响,探究过劳对小鼠脾脏造血功能的影响及过劳死的相关发病机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要实验试剂与仪器

ELISA 检测试剂盒购自武汉尤尔生商贸有限公司,兔抗间隙连接蛋白 45(connexin 45,Cx45)抗体购自武汉博士德生物工程有限公司,山羊抗兔二抗购自上海萨博生物技术有限公司,PCR 引物、HE 染色试剂盒购自武汉赛维尔生物科技有限公司,电子天平购自梅特勒-托利多仪器有限公司,台式高速冷冻型微量离心机购自中国大龙兴创实验仪器股份公司,酶标检测仪购自美国伯腾仪器有限公司,病理切片机购自上海徕卡仪器有限公司,光学显微镜购自尼康株式会社,全自动动物血液细胞分析仪购自迈瑞医疗国际有限公司,荧光定量 PCR 仪购自北京东胜创新生物科技有限公司。

### 1.2 实验动物与分组

SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 18 只,9 周龄,体质量 20~23 g,由兰州大学实验动物中心提供。采用随机数字表法将 18 只小鼠分为 3 组($n=6$):对照(C)组、过劳 15 d(W1)组、过劳 30 d(W2)组。实验于兰州大学 GLP 实验室进行,实验前小鼠适应性喂养 1 周,饲养环境为室温(24±1) ℃、湿度 45%±10%,喂食标准饲料,自由饮水。本研究经兰州大学第一医院伦理委员会批准(LDYYLL2023-401)。

### 1.3 过劳模型的建立

每天将 W1 组和 W2 组小鼠放入水盒强迫水中站立 8 h,水盒内径长 41.5 cm、宽 29.5 cm、高 16.7 cm,水深(1±0.2) cm,水温(25±1)℃。再将小鼠装进专用束缚筒束缚 3 h,结束后放回笼中,自由活动及饮食。W1 组、W2 组分别连续造模 15、30 d,C 组正常饲养,

不做特殊处理。每天造模前测量每只小鼠的体质量及进食量。

1.4 取材

造模完成后,小鼠采用丙泊酚腹腔注射(100 mg/kg)麻醉后摘眼球取血至 EDTA 抗凝管中,过量丙泊酚致小鼠安乐死,分离其心脏、脾脏,用无菌 PBS 缓冲液清洗,称取脾脏质量,计算脾脏指数[脾脏指数=脾脏质量/小鼠体质量(mg/g)]。部分脾脏、心脏组织置于多聚甲醛溶液中固定,其余脾脏、心脏组织置于-80 ℃保存备用。W1 组动物仅观察到 15 d,其余两组观察到 30 d,之后取材,故结果中 W1 组的数据均截止到 15 d。

1.5 血常规检测

取血 0.5 mL 置于 EDTA 抗凝管,检测全血白细胞(white blood cell, WBC)、红细胞(red blood cell, RBC)、血小板(platelet count, PLT)数目及血红蛋白(hemoglobin, HGB)浓度。小鼠血液样品在 4 ℃冰箱保存,7 d 内完成检测。

1.6 HE 染色行病理形态学观察

取多聚甲醛溶液固定脾脏组织,PBS 冲洗多聚甲醛固定液,乙醇脱水,石蜡包埋。将石蜡组织块以 2 μm 厚度连续切片并置于载玻片上,37 ℃培养箱过夜,然后 65 ℃保持 2 h,石蜡切片用水脱蜡。将切片置于苏木精染液染 3~5 min,乙酸及氨水分色各数秒,流水冲洗 1 h 后入蒸馏水数秒。切片依次放入 85%、95%的梯度酒精脱水各 5 min,入伊红染液中染色 5 min。无水乙醇脱水,经二甲苯使切片透明,中性树胶封片。切片置于光学显微镜下观察,采集图像进行分析。

1.7 免疫组化染色

取心脏组织石蜡包埋,心肌横切面连续切片,每片厚约 4 μm;60 ℃烤片过夜;脱蜡水化;微波抗原修复;冷却至室温后每张切片滴加一抗(兔抗 Cx45 抗体)孵育过夜,PBS 洗涤脱色,滴加二抗(兔抗,HRP 标记);PBS 洗涤后二氨基联苯胺显色,苏木精复染细胞核,脱水与透明后封片。置于显微镜下观察,采集图像分析。

1.8 RT-qPCR 检测 mRNA 表达

根据试剂盒说明书要求,取出保存于-80 ℃的心脏、脾脏标本,提取各组小鼠心脏和脾脏组织中总 RNA,对浓度过高的 RNA 进行适当比例的稀释,使其终浓度为 200 ng/μL;配置反转录体系对 RNA 进行反转录,获得 cDNA;而后配制 RT-qPCR 反应体系,于荧光定量 PCR 仪上完成扩增;$2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对结果进行分析处理。小鼠脾脏趋化因子 CXC 配体 12(C-X-C motif chemokin ligand 12, CXCL12)、干细胞因子(stem cell factor, SCF)、Cx45 基因的引物序列见表 1。

**表 1 *SCF*、*CXCL12*、*Cx45* 基因的引物序列和片段大小**

| 基因 | 引物序列(5′→3′) | 片段大小/bp |
|---|---|---|
| *SCF* | ATAACCCTCAACTATGTCGCCG<br>GCATAACACGAGGTCATCCACT | 186 |
| *CXCL12* | AGTGACGGTAAACCAGTCAGCC<br>AGGGCACAGTTTGGAGTGTTGA | 116 |
| *Cx45* | AGCTCGGAGCAAACCCTATG<br>AATTCGTCGTCGGCCATCAT | 172 |

1.9 ELISA 定量检测

将脾脏组织充分研磨、离心,取上清液。加样(标准品及样本)100 μL,37 ℃孵育 1 h;吸弃,加检测溶液 A 100 μL,37 ℃孵育 1 h;洗板 3 次;加检测溶液 B 100 μL,37 ℃孵育 30 min;洗板 5 次;加 TMB 底物 90 μL,37 ℃孵育 10~20 min;每孔加入 50 μL 终止液,使用酶标仪在 450 nm 波长测定光密度值,并通过标准曲线测定各组样品中 SCF、CXCL12 浓度。

1.10 统计学分析

选用 SPSS 26.0 统计软件对实验数据进行分析,将所有数据进行正态性检验,满足正态分布的计量资料数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。小鼠体质量与进食量同一组内采用成对样本 $t$ 检验;体质量、进食量、脾脏指数、血常规、PCR、ELISA、免疫组化计量资料组间比较采用 ANOVA 单因素方差分析,进一步两两比较采用 Bonferroni 检验校准,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 小鼠一般情况、体质量、进食量及脾脏指数比较

与 C 组相比,W1 组、W2 组小鼠处理后皮毛灰暗欠光泽,活跃程度先增加后下降,全身毛发随着造模时间的增加逐渐出现浸湿现象,扎堆,精神状态变差。

小鼠体质量组内比较:C 组第 5、10、15、20、25、30 天体质量高于第 0 天,差异具有统计学意义($P$ 均<0.05),W1、W2 组内比较差异无统计意义($P$ 均>0.05)。W1、W2 组第 5、10、15、20、25、30 天的体质量与 C 组比较差异均无统计学意义($P$ 均>0.05),见表 2。

**表 2 各组小鼠体质量(g,$n=6$,$\bar{x}\pm s$)**

| 时间 | C 组 | W1 组 | W2 组 |
|---|---|---|---|
| 第 0 天 | 21.63±1.38 | 22.05±0.49 | 23.78±1.32[b] |
| 第 5 天 | 22.80±1.79[a] | 22.73±0.41[a] | 23.68±1.09 |
| 第 10 天 | 23.20±1.43[a] | 22.43±0.76[a] | 23.25±0.86 |
| 第 15 天 | 23.50±1.22[a] | 22.27±0.66 | 23.52±1.22 |
| 第 20 天 | 22.97±1.50[a] | - | 23.48±1.18 |
| 第 25 天 | 23.78±1.37[a] | - | 23.42±0.93 |
| 第 30 天 | 23.37±1.63[a] | - | 23.90±0.82 |

a:$P<0.05$,与本组第 0 天比较;b:$P<0.05$,与 C 组同一时间点比较

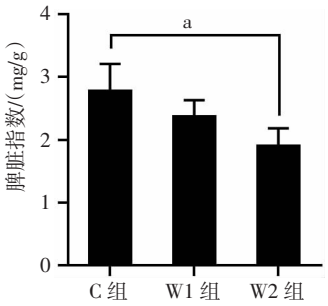
小鼠进食量:与第 0 天比较,C 组、W2 组第 5、10、15、20、25、30 天和 W1 组第 5、10 天进食量差异无统计学意义($P$ 均>0.05)。W1 组第 15 天,W2 组第 0、15、25 天的进食量明显高于 C 组,差异具有统计学意义($P$ 均<0.05),见表 3。

**表 3 各组小鼠进食量**(g,$n$=6,$\bar{x}\pm s$)

| 时间 | C 组 | W1 组 | W2 组 |
|---|---|---|---|
| 第 0 天 | 3.15±0.33 | 3.23±0.26 | 3.59±0.16[b] |
| 第 5 天 | 2.83±0.30 | 3.15±0.57 | 3.40±0.55 |
| 第 10 天 | 2.90±0.20 | 3.18±0.35 | 3.21±0.24 |
| 第 15 天 | 2.84±0.43 | 3.58±0.33[ab] | 3.37±0.20[b] |
| 第 20 天 | 2.89±0.19 | – | 3.34±0.48 |
| 第 25 天 | 3.02±0.20 | – | 3.42±0.22[b] |
| 第 30 天 | 3.17±0.21 | – | 3.46±0.22 |

a:$P$<0.05,与本组第 0 天比较;b:$P$<0.05,与 C 组同一时间点比较

与 C 组相比,W2 组脾脏指数下降,且差异具有统计学意义($P$=0.001),其余组两两对比差异均无统计学意义($P$ 均>0.05),见图 1。




a: $P$<0.05

**图 1 各组小鼠脾脏指数**

2.2 血常规检测

各组小鼠白细胞、红细胞、血红蛋白和血小板结果见表 4。与 C 组相比,W2 组白细胞、红细胞数目,HGB 浓度升高($P$<0.05),其余组两两比较差异无统计学意义($P$ 均>0.05);W1 组、W2 组 PLT 数目明显增加($P$ 均<0.05),W1 组与 W2 组相比差异无统计学意义($P$>0.05)。

**表 4 各组小鼠 WBC、RBC、HGB、PLT 比较**($n$=6,$\bar{x}\pm s$)

| 组别 | RBC/($10^{12}$/L) | WBC/($10^9$/L) | PLT/($10^9$/L) | HGB/(g/L) |
|---|---|---|---|---|
| C 组 | 8.95±0.55 | 7.08±2.01 | 489.33±273.57 | 139.33±10.39 |
| W1 组 | 10.29±0.48 | 8.33±1.50 | 939.00±336.34[a] | 154.17±8.16 |
| W2 组 | 11.09±1.70[a] | 9.60±0.89[a] | 874.83±97.04[a] | 167.00±19.89[a] |

a:$P$<0.05,与 C 组比较

2.3 HE 染色分析

小鼠脾脏病理切片见图 2,与 C 组和 W1 组相比,W2 组小鼠脾脏 HE 染色红髓与白髓分界欠清,红髓比例增大。

2.4 *Cx*45、*SCF*、*CXCL*12 基因表达水平

RT-qPCR 检测各组小鼠心脏组织中 *Cx*45,脾脏组织中 *SCF*、*CXCL*12 的 mRNA 表达水平(表 5),与 C 组相比,W2 组心脏组织中 *Cx*45 表达明显增加($P$<0.05),其余各组两两比较差异无统计学意义($P$ 均>0.05);W2 组 *SCF* 表达较 C 组及 W1 组明显增加($P$<0.05),其余组间比较差异无统计学意义($P$>0.05);3 组小鼠 *CXCL*12 的表达差异无统计学意义($P$ 均>0.05)。

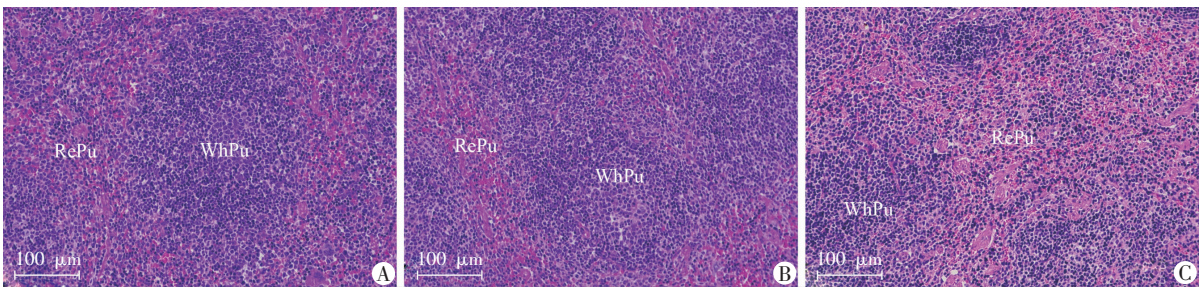
**表 5 各组小鼠 *Cx*45、*SCF* 和 *CXCL*12 的 mRNA 表达水平**($n$=3,$\bar{x}\pm s$)

| 组别 | *Cx*45 | *SCF* | *CXCL*12 |
|---|---|---|---|
| C 组 | 1.02±0.22 | 1.04±0.35 | 1.01±0.15 |
| W1 组 | 1.29±0.18 | 1.44±0.52[b] | 1.02±0.09 |
| W2 组 | 1.78±0.17[a] | 2.57±0.23[a] | 0.89±0.07 |

a:$P$<0.05,与 C 组比较;b:$P$<0.05,与 W2 组比较

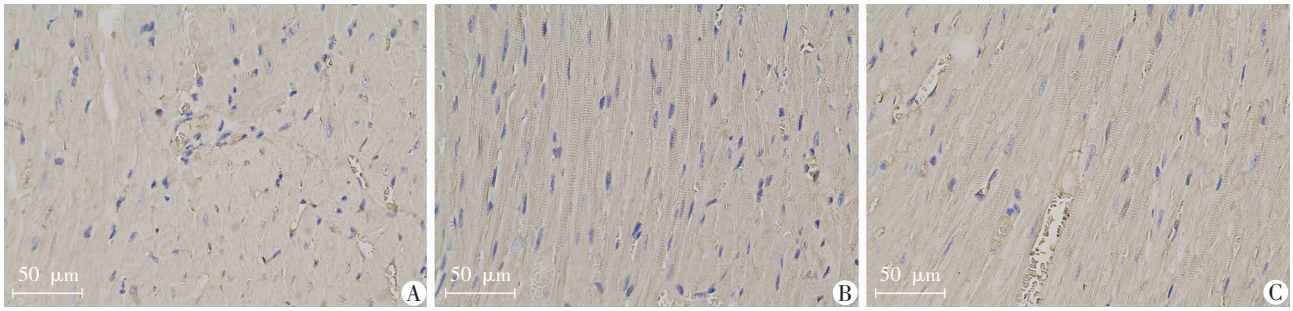
2.5 免疫组织化学法定量分析心脏 Cx45 蛋白表达

W1 组、W2 组黄棕色颗粒增多。使用 Image J 软件对图像进行测量分析,用平均光密度值表示 Cx45 蛋白含量,结果示:W1 组和 W2 组小鼠心尖的 Cx45 蛋白含量明显高于 C 组($P$<0.05),W1 组与 W2 组间差异无统计学意义($P$>0.05,图 3、4)。



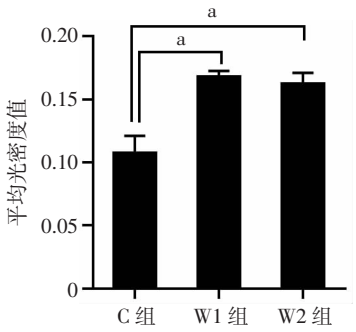

WhPu:白髓;RePu:红髓
A:C 组;B:W1 组;C:W2 组

**图 2 各组小鼠脾脏病理学变化**




A:C 组;B:W1 组;C:W2 组

**图 3 免疫组化检测各组小鼠心肌组织中 Cx45 蛋白含量**




a: $P<0.05$

**图 4 各组小鼠心肌组织中 Cx45 蛋白含量分析**

### 2.6 ELISA 检测 SCF、CXCL12 表达

W2 组脾脏组织中 SCF 蛋白表达量较 C 组及 W1 组明显增加($P<0.05$),W1 组较 C 组 SCF 蛋白表达增加,但差异无统计学意义($P>0.05$);3 组小鼠脾脏组织中 CXCL12 的蛋白表达组间两两比较差异均无统计学意义($P$ 均>0.05,表 6)。

**表 6 各组小鼠 SCF 和 CXCL12 表达水平**(pg/mL,$n=4$,$\bar{x}\pm s$)

| 组别 | SCF | CXCL12 |
|---|---|---|
| C 组 | 162.67±54.18 | 1 145.61±320.49 |
| W1 组 | 193.47±17.60 | 1 255.35±140.84 |
| W2 组 | 378.56±7.83[ab] | 1 397.57±116.27 |

a:$P<0.05$,与 C 组比较;b:$P<0.05$,与 W1 组比较

## 3 讨论

### 3.1 过劳可破坏心肌细胞间的紧密连接

过劳是指工作时间过长、劳动强度过大、心理压力过重导致精疲力竭的亚健康状态。本实验参考疲劳型亚健康小鼠模型的建立方法[10],选用强迫水中站立结合束缚实验建立过劳模型,实现在生理和心理方面对小鼠双重负荷干预,构建了重复性较高且符合人类过劳特点的动物模型。

Cx45 是心肌细胞间的一种缝隙连接蛋白,介导了动作电位在心肌细胞间的传播,是心脏电信号的主要通道[11]。已观察到在心肌梗死和终末期心力衰竭后,心肌 Cx45 蛋白水平的增加[12]。有研究证明,过劳后大鼠心肌 Cx45 的表达增加[5],同样,在小鼠发生心肌梗死时,也检测到心脏 Cx45 蛋白上调[13]。本研究未采用以往过劳模型中的负重力竭游泳实验法,而是通过强迫水中站立结合束缚实验造模,旨在避免实验动物因负重力竭游泳而呛水感染对实验结果的干扰。为了验证过劳模型的有效性,本实验通过 RT-qPCR 和免疫组化检测了心脏 Cx45 mRNA 及蛋白的表达,结果显示:过劳小鼠心脏 Cx45 mRNA 及蛋白的表达量显著增加,与已往过劳研究结果一致[5]。本实验小鼠一般情况显示:过劳小鼠精神倦怠、活动量下降、扎堆、全身皮毛随着造模时间的增加逐渐出现浸湿、灰暗欠光泽的现象。小鼠进食量测量结果表明,过劳小鼠进食量明显较高,但小鼠体质量结果显示仅对照小鼠体质量随喂养时间增加而增加,过劳小鼠体质量并无明显增长。综上,说明本实验过劳模型建立有效。

### 3.2 过劳使脾脏合成的 SCF 增加诱发脾脏髓外造血

干细胞因子(stem cell factor, SCF),又称 Kitl,它主要是作为配体通过与 c-kit 结合而发挥生物学作用,对造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)等多种组织细胞具有广泛的生物学活性,是维持 HSC、c-kit+祖细胞以及红系发育所必需的生长因子,成年小鼠脾脏红髓区血窦周围内皮细胞及间质细胞会合成 SCF[14]。脾脏为成体小鼠造血的次级器官,在生理状态稳定的情况下,SCF 对小鼠脾脏造血功能无明显影响,而在骨髓纤维化、贫血、怀孕、感染和心肌梗死等应激条件下,SCF 表达水平升高,进一步会诱发脾脏髓外造血。所以,SCF 水平升高可作为脾脏造血活跃的标志。本实验结果显示:过劳小鼠脾脏 SCF 在基因和蛋白水平均

显著升高,说明过劳使脾脏合成的 SCF 增加,诱发了脾脏造血。

CXCL12 属于趋化因子家族,是许多细胞系统包括造血系统的主要调节因子,与其配体 CXCR4 特异性结合发挥作用。INRA 等[15]研究表明,在怀孕、失血等诱导的小鼠髓外造血中,CXCL12 表达显著增加。本实验中过劳小鼠脾脏中 CXCL12 基因和蛋白表达量无明显变化,其原因可能是过劳造成的损伤比较轻微,未达到与怀孕、失血等类似的损伤程度,尚不足以引起脾脏 CXCL12 的显著变化。

### 3.3 过劳诱发脾脏髓外造血使全血细胞数目过度增加形成血液高凝状态

血常规检测结果示:过劳能增加小鼠外周血中 WBC、RBC、PLT 数目,升高 HGB 浓度,并于 30 d 后超过正常值高限,表明过劳使小鼠全血细胞数目过度增加。小鼠脾脏 HE 染色结果表明,过劳小鼠脾脏造血区域红髓区比例增大,而红髓区是脾脏发挥造血功能的主要区域,说明过劳可能通过应激反应诱发小鼠脾脏髓外造血。髓外造血是通常被定义为在骨髓外产生成熟的红系和髓系祖细胞,这种情况几乎发生在任何导致骨髓渗透或无效造血的疾病中,是多种疾病的病理状态,髓外造血是否需要治疗或者能否作为疾病预后的标志并未明确[16]。

OTSUI 等[17]研究表明,过度劳累会缩短闭塞性血栓形成时间,从而加速血栓形成,但其机制仍有待阐明,长时间(≥每周 55 h)工作者比标准时间(每周 35~40 h)工作者卒中的风险更高[18]。结合本实验研究结果,过劳会造成脾脏髓外造血,使全血细胞增加,特别是过劳 15 d 即可显著升高外周血血小板计数,促进形成血液高凝状态,可能是上述研究中诱发血栓性疾病的根本原因。

本实验的局限性在于只研究了过劳 15、30 d 的全血细胞及相关造血因子的变化,未对更严重的过劳进行研究。但过劳至过劳死是一个慢性的疾病发展过程,在过劳 30 d 之后,小鼠脾脏造血功能变化还有待进一步探索。

综上所述,过劳可破坏心肌细胞间的紧密连接,增强脾脏造血功能,使全血细胞数目特别是血小板数目过度增加,形成血液高凝状态,这可能是过劳死相关心血管疾病的诱发因素之一。

**参考文献:**

[1] KIM I, KOO M J, LEE H E, *et al*. Overwork-related disorders and recent improvement of national policy in South Korea[J]. J Occup Health, 2019, 61(4): 288-296. DOI: 10.1002/1348-9585.12060.

[2] MIAO Q, LI J, PAN Y P, *et al*. Three cases of karoshi without the typical pathomorphological features of cardiovascular/cerebrovascular disease[J]. Am J Forensic Med Pathol, 2020, 41(4): 305-308. DOI: 10.1097/paf.0000000000000600.

[3] 陈苏衡, 甘露, 庄苗, 等. 过度劳累对大鼠动脉血管壁细胞外基质的影响[J]. 中国医学科学院学报, 2022, 44(2): 262-269. DOI: 10.3881/j.issn.1000-503X.14211.
CHEN S H, GAN L, ZHUANG M, *et al*. Overwork affects extracellular matrix of arterial vessel wall in rats[J]. Acta Acad Med Sin, 2022, 44(2): 262-269. DOI: 10.3881/j.issn.1000-503X.14211.

[4] 甘露, 陈苏衡, 庄苗, 等. 不同程度的过劳对大鼠动脉血管平滑肌细胞的影响[J]. 陆军军医大学学报, 2022(5): 461-468. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202108152.
GAN L, CHEN S H, ZHUANG M, *et al*. Effects of different levels of overworking on rat arterial smooth muscle cells[J]. J Army Med Univ, 2022(5): 461-468. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202108152.

[5] 杨博帆,史婧卓,李晶,等.大鼠过劳模型心脏 Cx43 和 Cx45 的表达[J]. 法医学杂志,2019, 35(5): 567-571. DOI:10.12116/j.issn.1004-5619.2019.05.010.
YANG B F, SHI J Z, LI J, *et al*. Expression of Cx43 and Cx45 in cardiomyocytes of an overworked rat model[J]. Fa Yi Xue Za Zhi, 2019, 35(5): 567-571. DOI:10.12116/j.issn.1004-5619.2019.05.010.

[6] FLUGE Ø, TRONSTAD K J, MELLA O. Pathomechanisms and possible interventions in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome (ME/CFS)[J]. J Clin Invest, 2021, 131(14): 150377. DOI: 10.1172/jci150377.

[7] 杨菊贤,卓杨.过劳死的发生和预防[J].中国行为医学科学,2006(07):577-579.
YANG J X, ZHUO Y. The occurrence and prevention of Karoshi[J]. Chin J Behav Med Sci, 2006(07):577-579.

[8] MEBIUS R E, KRAAL G. Structure and function of the spleen[J]. Nat Rev Immunol, 2005, 5(8): 606-616. DOI: 10.1038/nri1669.

[9] 吕慧珍, 艾玎. 心肌梗死后造血系统的变化[J]. 自然杂志, 2022, 44(2): 96-102. DOI: 10.3969/j.issn.0253-9608.2022.02.003.
LYU H Z, AI D. Changes in hematopoietic system after myocardial infarction[J]. Chin J Nat, 2022, 44(2): 96-102. DOI: 10.3969/j.issn.0253-9608.2022.02.003.

[10] 刘艳艳, 程静茹, 余克强, 等. 疲劳型亚健康小鼠模型的研制[J]. 广东医学, 2012, 33(1): 21-24. DOI: 10.

3969/j.issn.1001-9448.2012.01.013.
LIU Y Y, CHENG J R, YU K Q, *et al*. Construction of fatigue-type sub-health mouse model[J]. Guangdong Med J, 2012, 33(1): 21-24. DOI: 10.3969/j.issn.1001-9448.2012.01.013.

[11] MACIUNAS K, SNIPAS M, KRAUJALIS T, *et al*. The role of the Cx43/Cx45 gap junction voltage gating on wave propagation and arrhythmogenic activity in cardiac tissue[J]. Sci Rep, 2023, 13: 14863. DOI: 10.1038/s41598-023-41796-w.

[12] KOPANIC J, AL-MUGOTIR M, KIEKEN F, *et al*. Characterization of the Connexin45 carboxyl-terminal domain structure and interactions with molecular partners[J]. Biophys J, 2014, 106(10): 2184-2195. DOI: 10.1016/j.bpj.2014.03.045.

[13] LI J Y, KE H H, HE Y, *et al*. Transplantation of mesenchymal stem cells modulated Cx43 and Cx45 expression in rats with myocardial infarction[J]. Cytotechnology, 2018, 70(1): 225-234. DOI: 10.1007/s10616-017-0136-x.

[14] COMAZZETTO S, MURPHY M M, BERTO S, *et al*. Restricted hematopoietic progenitors and erythropoiesis require SCF from leptin receptor$^{+}$ niche cells in the bone marrow[J]. Cell Stem Cell, 2019, 24(3): 477-486. e6. DOI: 10.1016/j.stem.2018.11.022.

[15] INRA C N, ZHOU B O, ACAR M, *et al*. A perisinusoidal niche for extramedullary haematopoiesis in the spleen[J]. Nature, 2015, 527(7579): 466-471. DOI: 10.1038/nature15530.

[16] CHERNAK B J, RAMPAL R K. Chapter Three—Extramedullary hematopoiesis in myeloproliferative neoplasms: Pathophysiology and treatment strategies. International Review of Cell and Molecular Biology: volume 365[M]. United States: Academic Press, 2021: 97-116.

[17] OTSUI K, YAMAMOTO J, INOUE N. Overwork accelerates thrombotic reaction: implications for the pathogenesis of karoshi[J]. J Thromb Thrombolysis, 2018, 45(2): 222-224. DOI: 10.1007/s11239-017-1605-y.

[18] KIVIMÄKI M, JOKELA M, NYBERG S T, *et al*. Long working hours and risk of coronary heart disease and stroke: a systematic review and meta-analysis of published and unpublished data for 603 838 individuals[J]. Lancet, 2015, 386(10005): 1739-1746. DOI: 10.1016/S0140-6736(15)60295-1.

(收稿:2023-08-11;修回:2023-09-06)
(编辑 刘秋池)