利奈唑胺影响MEG-01巨核细胞增殖及血小板前体生成的代谢组学研究Δ

王　宁[1*]，杨　雅[1,2]，熊丽蓉[1]，孙凤军[1]，田衍平[3]，夏培元[1#]（1.陆军军医大学第一附属医院药剂科，重庆 400038；2.重庆医科大学附属儿童医院药剂科，重庆　401122；3.陆军军医大学组织学及胚胎学教研室，重庆 400038）

中图分类号　R978.1+9；R558+.2　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2024）23-2863-07
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2024.23.05

摘　要　目的　研究利奈唑胺（LZD）对MEG-01巨核细胞代谢及细胞增殖和血小板前体生成的影响，为阐明LZD诱导的血小板减少症的发病机制提供参考。**方法**　将MEG-01细胞接种于增殖培养基中，分为空白对照组（无处理）、溶剂对照组（4‰二甲基亚砜）和100、200、400、800 μg/mL LZD组，培养4 d后光镜下观察各组细胞增殖状态，进行细胞计数并检测细胞增殖活力。将细胞接种于分化培养基中，分为空白对照组（无处理）、溶剂对照组（4‰二甲基亚砜）和400 μg/mL LZD组，培养14 d后光镜下观察细胞的伪足生成情况，统计生成伪足的细胞比例及测量伪足相对长度，测定细胞中CD41、CD42b mRNA的表达水平。提取分化培养基中培养14 d的溶剂对照组和400 μg/mL LZD组细胞，运用液相色谱-串联质谱技术进行非靶向代谢组学和靶向能量代谢组学检测；在此基础上测量和观察添加丙酮酸（10 mmol/L）、LZD（400 μg/mL）+丙酮酸（10 mmol/L）培养14 d后细胞中丙酮酸相对含量及其对细胞增殖和伪足生成的影响。**结果**　400 μg/mL LZD可显著抑制MEG-01细胞增殖和伪足的生成（$P<0.01$）。400 μg/mL LZD处理后，MEG-01细胞的非靶向代谢组学分析结果显示，mTOR信号通路，丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢以及癌症的中心碳代谢等与能量代谢相关的途径发生了显著变化；进一步的靶向能量代谢组学分析结果显示，400 μg/mL LZD处理后MEG-01细胞中三磷酸腺苷、鸟苷三磷酸、丙酮酸相对含量较溶剂对照组显著减少（$P<0.01$），乳酸相对含量较溶剂对照组显著增加（$P<0.01$）。与LZD组相比，LZD+丙酮酸组细胞中丙酮酸相对含量、细胞计数、生成伪足的细胞比例和伪足相对长度均显著升高/增加（$P<0.01$）。**结论**　LZD可能通过抑制线粒体能量代谢导致丙酮酸生成减少，进而抑制巨核细胞增殖和血小板前体生成，最终导致血小板减少症的发生。

关键词　利奈唑胺；血小板减少症；血小板前体；能量代谢；丙酮酸

Metabolomics study on the effect of linezolid on the proliferation of MEG-01 megakaryocytes and the generation of platelet precursors

WANG Ning[1], YANG Ya[1,2], XIONG Lirong[1], SUN Fengjun[1], TIAN Yanping[3], XIA Peiyuan[1]（1. Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Army Medical University, Chongqing 400038, China; 2. Dept. of Pharmacy, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 401122, China; 3. Histology and Embryology Teaching and Research Section, Army Medical University, Chongqing 400038, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To investigate the metabolic changes in MEG-01 megakaryocytes after treatment with linezolid (LZD) from metabolomic perspective and its impact on the the proliferation of cells and generation of platelet precursors. **METHODS** MEG-01 cells were seeded in proliferation medium and divided into blank control group (untreated), solvent control group (4‰DMSO), and 100, 200, 400, 800 μg/mL LZD groups. The proliferation status of cells in each group was observed under the microscope; cell proliferation and viability were assessed. Cells were also seeded in differentiation medium and divided into blank control group (untreated), solvent control group (4‰DMSO), and 400 μg/mL LZD group; after 14 days of culture, platelet precursor generation was observed

Δ**基金项目**　国家自然科学基金项目（No.82102448）；重庆英才创新领军人才项目（No.425Z2P12D）

＊**第一作者**　硕士研究生。研究方向：抗感染药物药理学。E-mail：wangning588@163.com

＃**通信作者**　主任药师，教授，博士生导师。研究方向：抗感染药物药理学。E-mail：peiyuan_xia@tmmu.edu.cn

under the microscope; immunofluorescence staining was performed to count the proportion of cells producing pseudopodia, the relative length of pseudopodia was measured, and the expression levels of CD41 and CD42b mRNA were assessed. Cells from the solvent control group and the 400 μg/mL LZD group, cultured in differentiation medium for 14 days, were extracted and subjected to non-targeted metabolomics and targeted energy metabolomics analysis using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. The relative content of pyruvate in cells, after being cultured for 14 days with the addition of pyruvate (10 mmol/L) or LZD (400 μg/mL)+pyruvate (10 mmol/L), was measured and observed, as well as its effects on cell proliferation and platelet precursor generation. **RESULTS** 400 μg/mL LZD could significantly inhibit the proliferation of MEG-01 cells and the generation of platelet precursors ($P<0.01$). Non-targeted metabolomic analysis of MEG-01 cells after 400 μg/mL LZD treatment revealed significant changes in energy metabolism-related pathways such as mTOR signaling pathway, alanine, aspartate and glutamate metabolism, and central carbon metabolism in cancer. Targeted energy metabolomic analysis further showed that the relative contents of adenosine triphosphate, guanosine triphosphate, and pyruvate in MEG-01 cells were significantly reduced ($P<0.01$), while the relative contents of lactate were significantly increased ($P<0.01$). Compared with the LZD group, the relative content of pyruvate, cell count, the proportion of cells producing pseudopodia and the relative length of pseudopodia were significantly increased in the LZD+pyruvate group ($P<0.01$). **CONCLUSIONS** LZD may reduce pyruvate production by inhibiting mitochondrial energy metabolism, thereby suppressing megakaryocyte proliferation and platelet precursor production, ultimately leading to the occurrence of thrombocytopenia.

KEYWORDS linezolid; thrombocytopenia; platelet precursor; energy metabolism; pyruvate

近年来，耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*，MRSA）的感染率和感染者病死率居高不下，严重威胁着人类健康[1]。利奈唑胺（linezolid，LZD）作为噁唑烷酮类药物，因具有良好的抗菌活性和组织穿透力，已成为临床治疗MRSA感染的主要药物[2]。但随着LZD的广泛使用，关于其不良反应的报道逐渐增多，其中以LZD诱导的血小板减少症（linezolid-induced thrombocytopenia，LIT）的发生率最高，为11.8%～43.0%[3－6]。若LIT未及时发现并得到救治，可危及患者生命。因此，对LIT的发病机制进行深入研究，发现并确定其发生的关键机制，可为临床防治LIT、促进LZD的安全合理使用、提高MRSA感染的救治水平奠定基础。

已有研究发现，LZD对血小板并没有直接毒性，LIT发生的直接原因主要是血小板生成减少[7－8]。血小板生成受多种因素共同调节，包括信号通路、转录因子及细胞代谢等[9－10]。LZD通过与核糖体rRNA的50S亚单位结合，阻止细菌蛋白质的合成从而发挥抗菌作用[11]。人体细胞线粒体蛋白质合成系统与细菌有高度的相似性，既往研究证实，LZD会对细胞的线粒体功能造成损害，引发细胞代谢紊乱，进而影响细胞的增殖、分化和细胞因子的生成[12－14]。另有学者在针对辅助性T细胞17的研究中发现，LZD会导致细胞中能量代谢相关产物——丙酮酸的含量显著减少，而通过添加外源性丙酮酸可以恢复LZD引起的能量代谢异常，并恢复细胞因子的生成[13]。但上述文献中的研究对象为肿瘤细胞、T细胞等，并非具有生成血小板功能的巨核细胞。本研究以常用于研究巨核细胞产板功能的MEG-01巨核细胞作为研究对象，利用代谢组学方法研究LZD对巨核细胞代谢的影响，并评估细胞增殖及血小板前体生成情况，旨在进一步探究LZD在LIT发病机制中的影响。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器主要包括IX71型倒置显微镜（日本Olympus公司），TC-20型细胞计数仪、CFX-96型荧光定量聚合酶链式反应（PCR）仪（美国Bio-Rad公司），LSM-880型激光共聚焦显微镜（德国Carl Zeiss公司），Varioskan™ LUX型多功能酶标仪（美国Thermo Fisher Scientific公司），TripleTOF™ 6600型质谱仪（美国AB SCIEX公司），1290 Infinity LC型超高压液相色谱仪（美国Agilent公司）。

1.2 主要药品与试剂

LZD标准品（批号HY-10394，纯度≥99%）购自美国MCE公司；二甲基亚砜（dimethyl sulfoxide，DMSO；批号D2650）、丙酮酸标准品（批号P8574，纯度≥99%）均购自美国Sigma公司；RPMI-1640培养基（批号SH30809.01）购自美国Cytiva公司；胎牛血清（货号10099-141）购自美国Gibco公司；CCK-8细胞活性检测试剂盒、β-微管蛋白（β-tubulin）抗体、DAPI染色剂（批号分别为C0037、AF2835、C1005）均购自上海碧云天生物技术股份有限

公司；血小板生成素（thrombopoietin，TPO；批号300-18-100UG）购自美国Thermo Fisher Scientific公司；甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）、CD41、CD42b引物均由生工生物科技（上海）有限责任公司合成；实时荧光定量PCR（qRT-PCR）试剂盒（批号11736051）购自瑞士Roche公司。

1.3 细胞

MEG-01细胞（人成巨核细胞白血病细胞）由陆军军医大学复合伤研究所惠赠，液氮保存。

2 方法

2.1 细胞增殖和活力检测

将MEG-01细胞培养于增殖培养基（90% RPMI-1640培养基+10%胎牛血清）中，按照每孔接种1×10^5个的方式将细胞接种于12孔板中。将培养至对数生长期的MEG-01细胞分为空白对照组（无处理）、溶剂对照组（4‰DMSO）和100、200、400、800 μg/mL LZD组（质量浓度依据前期预实验结果设置），每组设置5个复孔。培养4 d后于光镜下观察各组细胞增殖状态，并使用细胞计数仪计数细胞。按照相应试剂盒说明书操作，采用CCK-8法检测各组细胞的增殖活力。

2.2 血小板前体生成情况观察

将MEG-01细胞接种于分化培养基（添加50 ng/mL TPO）中培养。将培养至对数生长期的MEG-01细胞分为空白对照组（无处理）、溶剂对照组（4‰DMSO）和400 μg/mL LZD组（质量浓度根据“2.1”项下结果确定），每组设置5个复孔。培养14 d后收集细胞，于光镜下观察细胞的血小板前体——伪足生成情况并采集图像。将分化后的细胞以4%多聚甲醛固定，加入β-tubulin抗体进行免疫荧光染色，使用DAPI染色剂复染细胞核。使用激光共聚焦显微镜采集图像，观察视野中各组巨核细胞生成伪足的情况，每组至少记录5个视野，以至少生成1条伪足为判定标准计算各视野中生成伪足的细胞比例。使用仪器自带软件测量伪足长度，每个视野中选取5个伪足进行测量。以空白对照组中1个伪足的长度测量值为标准，计算其余伪足的相对长度并以此进行统计分析。

2.3 CD41、CD42b mRNA表达检测

根据“2.2”项下方法进行细胞分组与处理。收集分化培养基中培养14 d的细胞，使用Trizol试剂裂解，提取总RNA。以GAPDH为内参，根据qRT-PCR试剂盒使用说明书方法检测血小板标记物CD41、CD42b mRNA表达水平。引物序列及产物长度见表1。

表1 PCR引物序列及产物长度

基因	引物序列（5′→3′）	产物长度/bp
CD41-F313	上游：GATGAGACCCGAAATGTAGGC	155
CD41-R449	下游：GTCTTTCTAGGACGTTCCAGTG	
CD42b-F57	上游：CTGTGAGGTCTCCAAAGTGGC	145
CD42b-R221	下游：GTGAGGCGAGTGTAAGGCATC	
GAPDH-F108	上游：GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	138
GAPDH-R304	下游：GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG	

2.4 非靶向代谢组学及靶向能量代谢组学检测

根据“2.2”项下方法进行细胞分组与处理。因前期实验已证实，细胞于分化培养基中培养14 d后，DMSO对巨核细胞增殖及伪足的生成无显著影响，故本研究仅取溶剂对照组和LZD组细胞（各取6×10^5个）进行代谢组学研究。用预冷生理盐水洗涤细胞2次，用400 μL冷甲醇-乙腈（1∶1，*v*/*v*）提取细胞中代谢产物。在4 ℃下，以14 000×*g*离心20 min，收集上清液并干燥，然后再溶解于100 μL乙腈-水（1∶1，*v*/*v*）溶液中。样品送往上海中科新生命生物科技有限公司，由其运用液相色谱-串联质谱技术完成非靶向代谢组学和靶向能量代谢组学检测。在非靶向代谢组学检测过程中，首先进行主成分分析，从总体上确定两组间存在显著差异；而后以变量投影重要性（variable importance in projection，VIP）值≥1、$P<0.05$且差异倍数≥1.2或者差异倍数≤0.83为标准，进行差异代谢产物筛选；最后，利用京都基因与基因组百科全书（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes，KEGG）数据库对差异代谢产物进行通路富集分析。根据非靶向代谢组学检测结果，进一步进行靶向能量代谢检测分析，并计算细胞能量代谢相关产物的相对含量。

2.5 添加丙酮酸对细胞增殖及血小板前体生成的影响

为评估外源性丙酮酸对细胞增殖及血小板前体生成的影响，将MEG-01细胞分别接种于分化培养基和增殖培养基中，并均分为溶剂对照组（4‰DMSO）、丙酮酸组（10 mmol/L丙酮酸）、LZD组（400 μg/mL LZD）、LZD+丙酮酸组（10 mmol/L丙酮酸+400 μg/mL LZD）并作相应处理，每组设置5个复孔。细胞于增殖培养基中培养4 d后进行细胞计数；于分化培养基中培养14 d后进行细胞内丙酮酸相对含量测定（方法同“2.4”项下），并观察血小板前体生成情况（方法同“2.2”项下）。

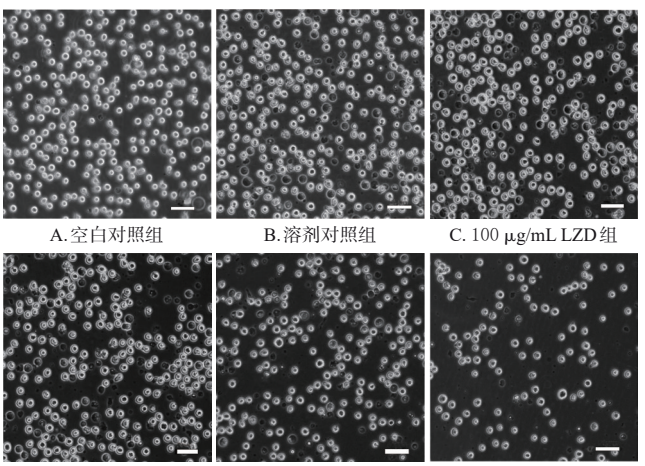
2.6 统计学方法

使用SPSS 27.0软件对实验数据进行统计分析。计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用LSD-*t*检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 LZD抑制MEG-01细胞增殖和活力

光镜下观察结果显示：与空白对照组比较，溶剂对照组细胞的增殖未受到明显影响，但LZD组细胞增殖受到了明显抑制，且抑制作用随着药物浓度的增加而增强，见图1。各组细胞计数及CCK-8实验结果显示：与空白对照组比较，溶剂对照组细胞计数及细胞增殖活力差异均无统计学意义（$P>0.05$）；100、200、400、800 μg/mL LZD组细胞计数均显著减少（$P<0.01$），800 μg/mL LZD组细胞增殖活力显著降低（$P<0.01$）。结果见表2。



A. 空白对照组　B. 溶剂对照组　C. 100 μg/mL LZD组

D. 200 μg/mL LZD组　E. 400 μg/mL LZD组　F. 800 μg/mL LZD组

图1　各组MEG-01细胞的增殖显微图（标尺为50 μm）

表2　各组细胞计数及细胞增殖活力比较（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

组别	细胞计数/×10⁵个	细胞增殖活力/%
空白对照组	6.51±0.49	89.96±1.79
溶剂对照组	7.16±0.50	91.16±2.96
100 μg/mL LZD组	5.55±0.18[a]	89.83±3.10
200 μg/mL LZD组	4.52±0.35[a]	87.36±3.43
400 μg/mL LZD组	3.93±0.29[a]	90.43±2.10
800 μg/mL LZD组	2.43±0.12[a]	76.87±4.70[a]

a：与空白对照组比较，$P<0.01$。

3.2 LZD抑制血小板前体生成

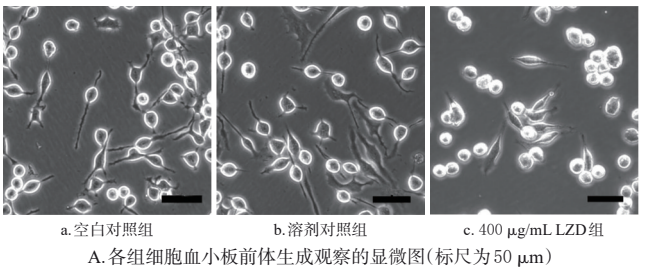
与空白对照组比较，溶剂对照组生成伪足的细胞比例、伪足相对长度差异均无统计学意义（$P>0.05$）；400 μg/mL LZD组生成伪足的细胞比例显著降低（$P<0.01$），且伪足相对长度显著减少（$P<0.01$）。结果见图2、表3。

3.3 LZD不影响CD41和CD42b mRNA的表达

qRT-PCR实验结果显示，400 μg/mL LZD处理后细胞中CD41、CD42b mRNA表达水平差异无统计学意义（$P>0.05$）（具体结果略）。

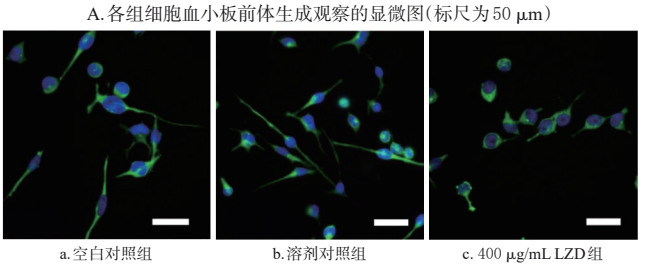
3.4 LZD改变巨核细胞的代谢

主成分分析结果显示，与溶剂对照组比较，400 μg/mL LZD组细胞的代谢谱发生了显著变化（图3A）。400 μg/mL LZD组细胞内41种代谢产物含量显著升高（$P<0.05$），134种代谢产物含量显著降低（$P<0.05$），详见图3B、图3C。对显著性差异代谢产物进行KEGG代谢通路富集，结果显示，包括mTOR信号通路（mTOR signaling pathway），丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢（alanine, aspartate and glutamate metabolism），癌症的中心碳代谢（central carbon metabolism in cancer）等与能量代谢相关的途径受到了显著影响，详见图3D。



a. 空白对照组　b. 溶剂对照组　c. 400 μg/mL LZD组

A. 各组细胞血小板前体生成观察的显微图（标尺为50 μm）



a. 空白对照组　b. 溶剂对照组　c. 400 μg/mL LZD组

B. 各组细胞血小板前体生成观察的免疫荧光染色图（标尺为50 μm）

图2　LZD对血小板前体生成的影响

表3　各组细胞血小板前体生成相关指标比较（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

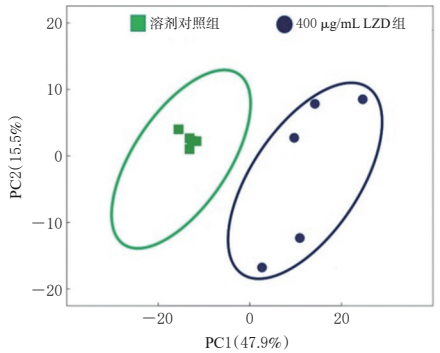
组别	生成伪足的细胞比例/%	伪足相对长度
空白对照组	76.31±4.19	0.94±0.16
溶剂对照组	78.14±2.47	0.89±0.12
400 μg/mL LZD组	47.22±5.18[a]	0.56±0.15[a]

a：与空白对照组比较，$P<0.01$。

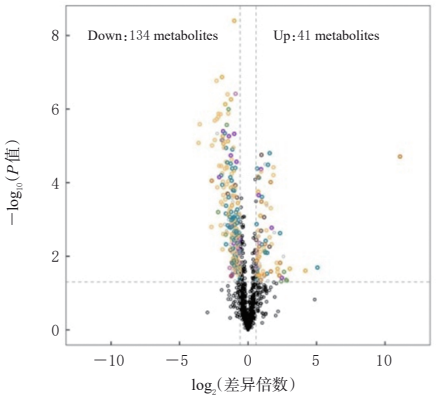
靶向能量代谢检测分析结果显示，与溶剂对照组比较，400 μg/mL LZD组细胞中能量物质三磷酸腺苷（adeno- sine triphosphate，ATP）、鸟苷三磷酸（guanosine triphosphate，GTP）相对含量显著减少（$P<0.01$）；糖酵解过程产生的中间产物——丙酮酸相对含量显著减少（$P<0.01$），乳酸（lactic acid，LA）相对含量显著增加（$P<0.01$）。结果见表4。

3.5 加入丙酮酸后逆转了LZD引起的细胞增殖抑制及血小板前体生成障碍

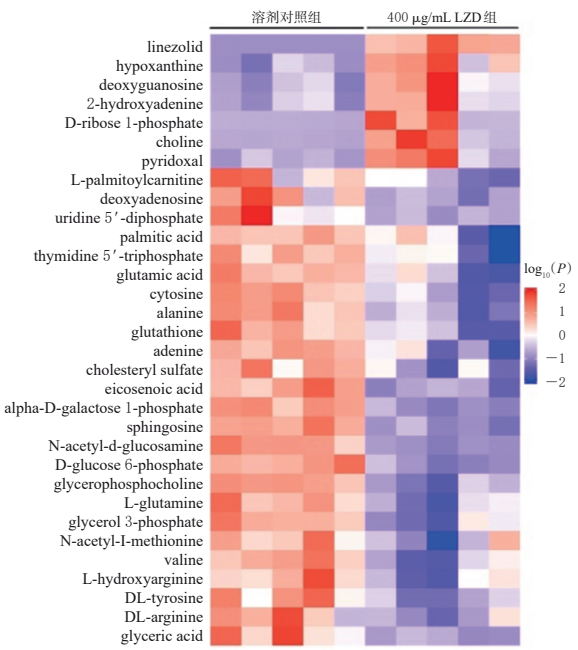
与溶剂对照组比较，丙酮酸组细胞中丙酮酸相对含量、细胞计数、生成伪足的细胞比例、伪足相对长度差异均无统计学意义（$P>0.05$），LZD组细胞中丙酮酸相对含量、细胞计数、生成伪足的细胞比例及伪足相对长度均显著降低/减少（$P<0.01$）。与LZD组比较，LZD+丙酮酸组细胞中丙酮酸相对含量、细胞计数、生成伪足的细胞比例、伪足相对长度均显著升高/增加（$P<0.01$）。结果见图4、表5。



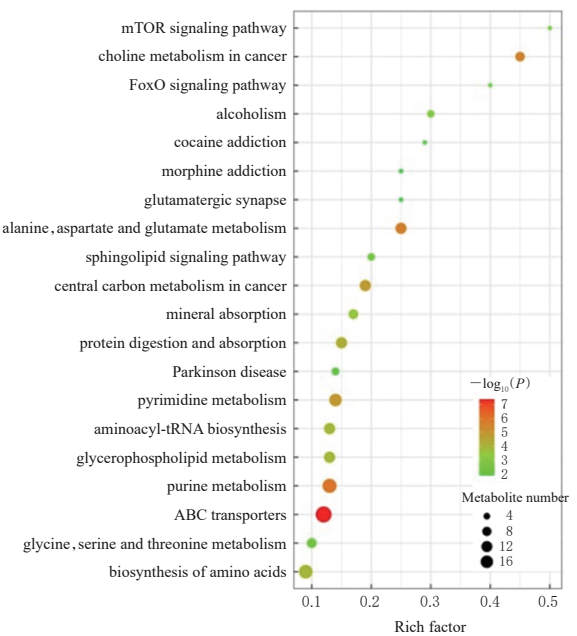
A. 主成分分析结果



B. 存在变化的代谢产物火山图



C. 存在变化的代谢产物(排名前32)热图



D. 存在变化的代谢产物KEGG通路(排名前20)富集分析

图3　非靶向代谢组学检测LZD对巨核细胞代谢的影响

表4　两组细胞靶向能量代谢相关产物相对含量比较($\bar{x}\pm s$,$n=5$)

组别	ATP	GTP	丙酮酸	LA	PEP
溶剂对照组	1.04±0.14	1.02±0.15	1.00±0.07	1.03±0.11	0.98±0.06
400 μg/mL LZD组	0.46±0.07[a]	0.56±0.09[a]	0.62±0.10[a]	1.35±0.17[a]	1.01±0.03

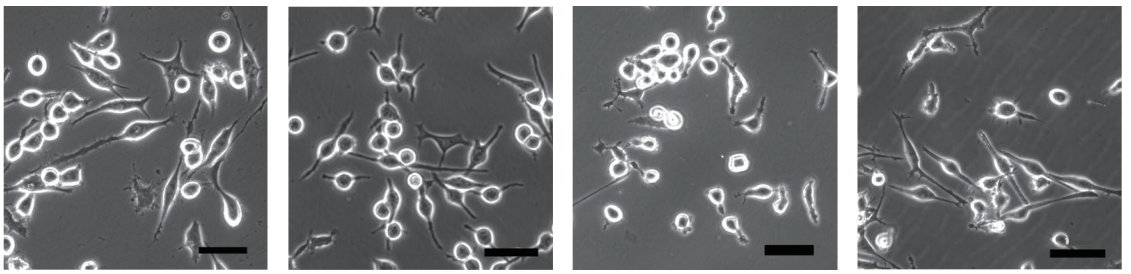
a:与溶剂对照组比较,$P<0.01$;PEP:磷酸烯醇丙酮酸(phosphoenolpyruvic acid)。

4　讨论

4.1　LZD抑制巨核细胞增殖及血小板前体生成的作用探讨

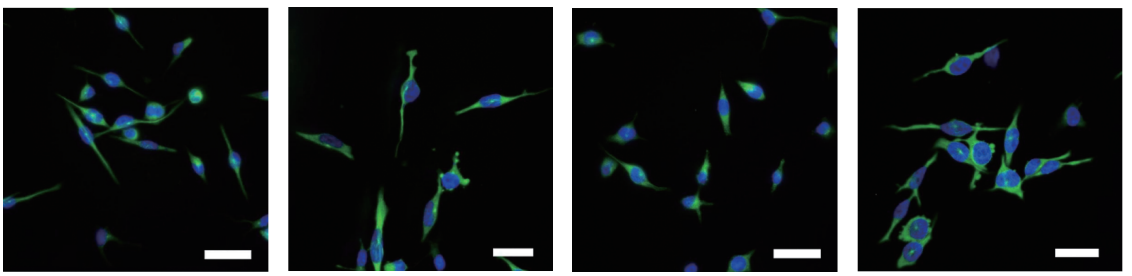
以巨核细胞为起点的血小板生成过程涉及巨核细胞的增殖、血小板前体的生成和脱落释放[15]。临床研究表明,部分LIT患者伴有全血细胞减少的骨髓抑制表现,因此LIT的发病机制可能与骨髓抑制造成巨核细胞减少有关[16]。本研究结果表明,LZD可抑制巨核细胞增殖,且这种抑制作用具有浓度依赖性趋势,这与临床研究中LIT发病率与LZD谷浓度呈正相关的现象一致[17],说明在LZD临床使用中合理控制药物剂量和用药时间进而避免药物蓄积很有必要。此外,本研究还发现,高浓度(800 μg/mL)的LZD会直接损伤巨核细胞的增殖活力,但在正常的临床使用中LZD血药浓度无法达到800 μg/mL[18],因此,笔者认为这种损伤作用与LIT的发生无关。为避免干扰,笔者在后续的实验中设置LZD浓度为400 μg/mL。

有研究报道,在对LIT患者进行骨髓活检时发现了足量且形态正常的成熟巨核细胞,说明LZD在成熟巨核细胞向后分化的某个环节也发挥作用[19]。本研究在预先添加TPO的分化培养基中进行细胞培养并观察伪足生成情况。结果表明,400 μg/mL LZD可显著抑制巨核细胞伪足生成。此外,qRT-PCR实验结果显示,400 μg/mL LZD处理后细胞中CD41、CD42b的mRNA表达水平均无显著变化。上述结果提示,LZD可抑制血小板前体的生成但不影响CD41和CD42b的表达。



a. 溶剂对照组　b. 丙酮酸组　c. LZD组　d. LZD+丙酮酸组

A. 各组细胞血小板前体生成观察的显微图（标尺为100 μm）



a. 溶剂对照组　b. 丙酮酸组　c. LZD组　d. LZD+丙酮酸组

B. 各组细胞血小板前体生成观察的免疫荧光染色图（标尺为100 μm）

图4　添加丙酮酸对LZD引起细胞增殖抑制及血小板前体生成障碍的影响

表5　添加丙酮酸后各组细胞中丙酮酸相对含量、细胞计数及血小板前体生成相关指标比较（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

组别	丙酮酸相对含量	细胞计数/×10⁵个	生成伪足的细胞比例/%	伪足相对长度
溶剂对照组	1.00±0.05	6.40±0.33	76.02±5.82	1.04±0.11
丙酮酸组	1.04±0.06	6.01±0.40	69.68±3.42	0.94±0.13
LZD组	0.60±0.05[a]	2.91±0.19[a]	44.38±2.76[a]	0.47±0.12[a]
LZD+丙酮酸组	1.07±0.10[b]	5.08±0.86[b]	60.66±5.72[b]	1.04±0.15[b]

a：与溶剂对照组比较，$P<0.01$；b：与LZD组比较，$P<0.01$。

4.2　能量代谢异常在LZD导致血小板生成减少中的作用探讨

既往研究发现，血小板的生成过程与线粒体能量代谢密切相关[20—21]。LZD会造成线粒体损伤，进而引起能量代谢异常[12—13,22]，但关于LZD对巨核细胞代谢影响的研究相对较少。本研究通过非靶向代谢组学分析表明，LZD改变了MEG-01巨核细胞代谢谱，且丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢，癌症的中心碳代谢等与能量代谢相关的途径受到了显著影响。进一步的靶向能量代谢检测分析结果也显示，与溶剂对照组比较，400 μg/mL LZD组细胞中ATP、GTP和丙酮酸相对含量减少，LA相对含量增加。以上结果表明，LZD干扰了巨核细胞线粒体能量代谢。结合相关文献，笔者推测能量代谢的异常可能是LZD造成细胞增殖和血小板前体生成减少的原因。在糖酵解过程中，丙酮酸是PEP的下一步产物，本研究检测到给药组细胞中丙酮酸相对含量减少，但PEP的相对含量没有减少，说明LZD导致血小板生成减少的作用可能发生在PEP生成丙酮酸这一阶段，后期将进行进一步研究以明确LZD抑制PEP转化生成丙酮酸的相关机制。

4.3　丙酮酸在调控巨核细胞血小板前体生成过程中的作用探讨

丙酮酸在能量代谢过程中扮演着重要角色，其既是糖酵解的最终产物，也是三羧酸循环的起始底物。在本研究中，通过LZD对MEG-01巨核细胞代谢谱的影响研究发现，LZD会引起巨核细胞能量代谢异常，丙酮酸生成减少。既往研究表明，LZD会抑制辅助性T细胞17线粒体的翻译，破坏线粒体活性和能量代谢，造成丙酮酸生成减少，同时引起细胞因子——白细胞介素13、白细胞介素17生成减少；而补充丙酮酸可调节细胞能量代谢并恢复细胞因子的生成[13]。此外，本研究也证实，通过补充丙酮酸可以恢复巨核细胞的增殖和血小板前体的生成。以上结果表明，丙酮酸在LZD导致的巨核细胞增殖减少和血小板前体生成障碍中具有关键作用。

综上所述，LZD可能通过抑制线粒体能量代谢导致丙酮酸生成减少，进而抑制巨核细胞增殖和血小板前体生成，最终导致LIT的发生。本研究结果对噁唑烷酮类药物的研发和临床应用具有重要意义，但因未进行体内实验，明确该机制仍需进一步的实验验证。此外，本研究为进一步研究LIT的致病机制提供了参考。

参考文献

[1] 全国细菌耐药监测网. 2022年度中国细菌耐药监测报告[EB/OL].（2023-11-20）[2024-09-15]. https://www.carss.cn/Report/Details?aId=917.
China National Bacterial Resistance Surveillance Network. 2022 annual report on bacterial resistance surveillance in China[EB/OL].（2023-11-20）[2024-09-15]. https://

www.carss.cn/Report/Details?aId=917.

[2] 王小文，赵松，宋阳，等. 利奈唑胺在治疗难治性中枢神经系统革兰阳性球菌感染中的价值[J]. 中华医院感染学杂志，2010，20(20)：3207-3209.
WANG X W，ZHAO S，SONG Y，et al. Value of linezolid in treatment of Gram-positive refractory central nervous system infection caused by coccus[J]. Chin J Nosocomiol，2010，20(20)：3207-3209.

[3] ZHANG L，YAN Y，LIAO R，et al. Effect of platelet parameters on linezolid-related thrombocytopenia in hospitalized patients[J]. Infect Drug Resist，2023，16：6145-6154.

[4] 王东晓，朱曼，郭代红，等. 930例糖肽类和噁唑烷酮类抗感染药物药品不良反应/事件报告分析[J]. 中国药物应用与监测，2017，14(1)：37-41.
WANG D X，ZHU M，GUO D H，et al.Analysis of 930 adverse drug reaction/event reports involving glycopeptide and oxazolidinone antibiotics[J].Chin J Drug Appl Monitor，2017，14(1)：37-41.

[5] 徐佳，黄琪，杨志玲. 我院区2016年利奈唑胺临床应用合理性评价[J]. 中国临床药理学与治疗学，2018，23(1)：110-115.
XU J，HUANG Q，YANG Z L. Evaluation of clinical rationality of linezolid in our hospital in 2016[J]. Chin J Clin Pharmacol Ther，2018，23(1)：110-115.

[6] LI Y，XU W. Efficacy and safety of linezolid compared with other treatments for skin and soft tissue infections：a meta-analysis[J]. Biosci Rep，2018，38(1)：BSR20171125.

[7] TSUJI Y，HOLFORD N H G，KASAI H，et al. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of linezolid-induced thrombocytopenia in hospitalized patients[J]. Br J Clin Pharmacol，2017，83(8)：1758-1772.

[8] TAJIMA M，KATO Y，MATSUMOTO J，et al. Linezolid-induced thrombocytopenia is caused by suppression of platelet production via phosphorylation of myosin light chain 2[J]. Biol Pharm Bull，2016，39(11)：1846-1851.

[9] 黄柏铭，刘翠翠，赵晶晶，等. 血小板生成研究进展[J]. 中国细胞生物学学报，2022，44(1)：51-58.
HUANG B M，LIU C C，ZHAO J J，et al. Current progress in thrombopoiesis[J]. Chin J Cell Biol，2022，44(1)：51-58.

[10] 赵志远，孟艳秋，甘慧，等. 血小板生成类药物研究进展[J]. 军事医学，2021，45(8)：626-631.
ZHAO Z Y，MENG Y Q，GAN H，et al. Research progress in thrombopoietin drugs[J]. Mil Med Sci，2021，45(8)：626-631.

[11] MARAY I，RODRÍGUEZ-FERRERAS A，ÁLVAREZ-ASTEINZA C，et al. Linezolid induced thrombocytopenia in critically ill patients：risk factors and development of a machine learning-based prediction model[J]. J Infect Chemother，2022，28(9)：1249-1254.

[12] MILOSEVIC T V，PAYEN V L，SONVEAUX P，et al. Mitochondrial alterations（inhibition of mitochondrial protein expression，oxidative metabolism，and ultrastructure）induced by linezolid and tedizolid at clinically relevant concentrations in cultured human HL-60 promyelocytes and THP-1 monocytes[J]. Antimicrob Agents Chemother，2018，62(3)：e01599-e01517.

[13] ALMEIDA L，DHILLON-LABROOY A，CASTRO C N，et al. Ribosome-targeting antibiotics impair T cell effector function and ameliorate autoimmunity by blocking mitochondrial protein synthesis[J]. Immunity，2021，54(1)：68-83.

[14] IMAI M，IZUMISAWA T，SAITO D，et al. Effects of antibacterial agents on cancerous cell proliferation[J]. Biol Pharm Bull，2023，46(5)：661-671.

[15] JUNT T，SCHULZE H，CHEN Z，et al. Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow[J]. Science，2007，317(5845)：1767-1770.

[16] CAI Y，CHAI D，FALAGAS M E，et al. Immediate hematological toxicity of linezolid in healthy volunteers with different body weight：a phase Ⅰ clinical trial[J]. J Antibiot，2012，65(4)：175-178.

[17] KAWASUJI H，TSUJI Y，OGAMI C，et al. Proposal of initial and maintenance dosing regimens with linezolid for renal impairment patients[J]. BMC Pharmacol Toxicol，2021，22(1)：13.

[18] 苟军强，李倩，尹东锋，等. 利奈唑胺相关血液及代谢系统不良反应研究进展[J]. 解放军医学杂志，2024，49(8)：965-972.
GOU J Q，LI Q，YIN D F，et al.Research progress on adverse reactions of linezolid related to blood and metabolic systems[J].Med J Chin PLA，2024，49(8)：965-972.

[19] BERNSTEIN W B，TROTTA R F，RECTOR J T，et al. Mechanisms for linezolid-induced anemia and thrombocytopenia[J]. Ann Pharmacother，2003，37(4)：517-520.

[20] CHEN S L，SUN K F，XU B C，et al. Akt-mediated mitochondrial metabolism regulates proplatelet formation and platelet shedding post vasopressin exposure[J]. J Thromb Haemost，2023，21(2)：344-358.

[21] FIDLER T P，CAMPBELL R A，FUNARI T，et al. Deletion of GLUT1 and GLUT3 reveals multiple roles for glucose metabolism in platelet and megakaryocyte function[J]. Cell Rep，2017，21(6)：1705.

[22] SORIANO A，MIRÓ O，MENSA J. Mitochondrial toxicity associated with linezolid[J]. N Engl J Med，2005，353(21)：2305-2306.

（收稿日期：2024-09-19　修回日期：2024-11-07）
（编辑：舒安琴）