DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.10.012
第23卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 10
2001年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2001

文章编号:1000-5404(2001)10-1157-04

论著

TGF-β_1 在烧伤合并内毒素血症骨髓粒单系造血变化中的作用

向德兵[1],刘友生[2],王水明[2],王晓东[2] (第三军医大学:[1]附属大坪医院野战外科研究所病理科,重庆 400042;[2]附属西南医院病理学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨TGF-β_1与c-kit相互关系及其在烧伤合并内毒素血症骨髓粒单系造血变化中的作用。方法 采用免疫组化法检测20% TBSA III度烧伤合并内毒素(1 μg/g体重)腹腔注射后1周内小鼠骨髓细胞TGF-β_1、c-kit表达,并对骨髓粒单系造血变化进行了动态观察。结果 烧伤合并内毒素血症早期骨髓粒单系略呈增生反应,继而呈现造血抑制。烧注后1、3 d骨髓细胞TGF-β_1表达增强,c-kit表达减弱;且TGF-β_1与骨髓CFU-GM和c-kit变化趋势相反。结论 TGF-β_1在烧伤合并内毒素血症骨髓粒单系造血抑制中起着重要作用,其机制与下调骨髓细胞c-kit表达有关。

关键词:烧伤;内毒素血症;骨髓;造血;转化生长因子-β_1
中图法分类号:R329.2;R515.3;R644 文献标识码:A

Effects of TGF-β_1 in bone marrow granulopoiesis in burns combined with endotoxemia of the mice

XIANG De-bing, LIU You-sheng, WANG Shui-ming, WANG Xiao-dong (Research Institute of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship between TGF-β_1 and c-kit and its role in bone marrow granulopoiesis in burns combined with endotoxemia in mice. Methods The expressions of TGF-β_1 and c-kit in BMNC were detected by immunohistochemiscal method within 7 days after 20% TBSA full-thickness skin burns combined with endotoxemia (induced by injection of LPS 1 μg/g body weight). The dynamic changes of bone marrow granulopoiesis was also observed. Results Bone marrow granulopoiesis was enhanced at the early stage of burns combined with endotoxemia, then suppressed. The expression of TGF-β_1 in BMNC was increased at the period from 1st to 3rd day after burns combined with LPS injection, which was contrary to the changes of CFU-GM and c-kit. Conclusion TGF-β_1 may play an important role in bone marrow granulopoiesis suppression in burns combined with endotoxemia, and one of the possible mechanism might be that TGF-β_1 down-regulate the expression of c-kit protein on the surface of BMNC.

Key words: burns; endotoxemia; bone marrow; hematopoiesis; transforming growth factor-β_1

骨髓粒单系造血功能的改变与烧伤后感染、免疫抑制和多器官功能障碍(MODS)密切相关,且直接影响疾病预后。本研究初步探讨烧伤合并内毒素血症骨髓粒单系造血变化及其可能机制,观测了20% TBSA III度烧伤合并内毒素(1 μg/g体重)腹腔注射后1周内小鼠外周血白细胞(WBC)、粒-巨噬细胞集落形成单位(Colony forming unit-granulocyte/ macrophage, CFU-GM)、骨髓细胞转化生长因子-β_1(Transforming growth factor-beta 1, TGF-β_1)及干细胞因子受体(Stem cell factor receptor, c-kit)表达。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组和致伤

7~8周龄健康昆明种雄性小鼠178只,体重20~24 g(本校实验动物中心提供),对168只小鼠随机分为烧伤合并内毒素注射组(简称烧注组,Burn+LPS),单纯烧伤组(简称单烧组,Burn),单纯内毒素注射组(简称单注组,LPS),每组56只,另以10只小鼠作总体对照,生理盐水对照组(简称对照组,Control)。

单烧组按文献[1]方法致20%TBSA III度体表烧伤,烧注组烧伤后、单注组背部脱毛后腹腔注射脂多糖(LPS,按1 μg/g体重),单烧组烧伤后、对照组动物背部脱毛后腹腔注射2 ml无菌生理盐水。时相点:烧伤后3、6、12 h和1、3、5、7 d。

1.2 外周血WBC计数

按常规方法进行。

1.3 粒单系祖细胞(CFU—GM)培养

参考葛忠良等[2]方法,培养体系:马血清1.2 ml,肌浸液0.5 ml,2.7%甲基纤维素1.4 ml,骨髓有核细胞(Bone marrow nucleated cell, BMNC)终浓度1×10^5/ml,RPMI1640液补足4 ml。5%CO_2孵箱内孵育7 d后倒置显微镜下计数CFU-GM集落数。

1.4 TGF-β_1、c-kit免疫组织化学染色

骨髓细胞涂片,采用S-P法(TGF-β_1多抗,中山公司,1∶75;c-kit单抗,Santa Cruz公司,1∶100)。结果判断:TGF-β_1以胞浆呈棕黄色或褐色为阳性染色,阳性细胞数:<10%,+;10%~20%,++;>20%,+++。c-kit以胞膜呈棕黄色或褐色为阳性染色,阳性细胞数:<1%,+;1%~5%,++;>5%,+++。

1.5 统计学处理

所有数据均以$\bar{x}\pm s$表示。以SPSS 9.0版专用统计分析程

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39770759)
作者简介:向德兵(1972—),男,四川省广安市人,硕士,医师,主要从事创伤血液病理方面的研究 电话:(023)68757374
收稿日期:2000-12-08;修回日期:2001-04-19

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

序对各组数据进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 外周血WBC的变化

烧注后3 h WBC显著高于正常对照组、单烧组和单注组，以后逐渐下降，3、5 d显著低于对照组和单注组，3 d显著低于单烧组，7 d有所回升，但仍低于正常对照组。单烧后3 d显著低于正常对照组。单注后12 h至3 d略低于正常对照组，但无显著性差异，见表1。

表1 外周血WBC的变化($\times 10^9$/L，$\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Dynamic changes of circulating WBC($\times 10^9$/L，$\bar{x}\pm s$)

Time	Control	Burn+LPS	Burn	LPS
	6.86±1.13			
3 h		8.73±1.22※△#	7.05±0.97	7.00±0.83
6 h		8.08±1.06	7.32±0.92	7.37±0.98
12 h		7.26±1.06	6.95±0.97	6.53±0.81
1 d		6.20±0.88	6.03±0.83	6.35±0.58
3 d		5.02±0.77※※△##	5.50±0.77※	6.80±0.85
5 d		5.28±0.86※##	5.97±0.81	7.18±0.59
7 d		5.62±0.76	6.55±0.82	6.68±0.96

※：$P<0.05$，※※：$P<0.01$ *vs* control；△：$P<0.05$ *vs* burn；#：$P<0.05$，##：$P<0.01$ *vs* LPS

2.2 骨髓CFU-GM变化

烧注后3、6 h CFU-GM略高于正常对照组，但很快就下降，伤后12 h就显著低于正常对照组，1、3 d达最低水平(见图1A，B)，持续至5 d仍显著低于正常对照组，并于伤后1、3 d显著低于单烧组和单注组。单烧后3、6 h略有升高，以后开始下降，1、3 d显著低于正常对照组。单注组仅在伤后1 d显著低于正常对照组，见表2。

表2 骨髓CFU-GM变化

Tab 2 Changes of bone marrow CFU-GM

Time	Control	Burn+LPS	Burn	LPS
	94.60±7.52			
3 h		96.00±8.34	97.17±7.52	90.17±7.22
6 h		95.83±6.65	101.00±7.21	93.17±8.45
12 h		85.50±6.47※	91.00±10.26	89.33±7.74
1 d		69.33±5.82※※△△##	86.33±6.28※	86.00±6.57※
3 d		73.17±5.42※※△##	84.00±6.45※	88.50±5.75
5 d		86.00±6.96※	90.83±6.46	93.17±7.14
7 d		86.83±7.19	93.50±6.92	95.83±7.67

※：$P<0.05$，※※：$P<0.01$ *vs* control；△：$P<0.05$，△△：$P<0.01$ *vs* burn；##：$P<0.01$ *vs* LPS

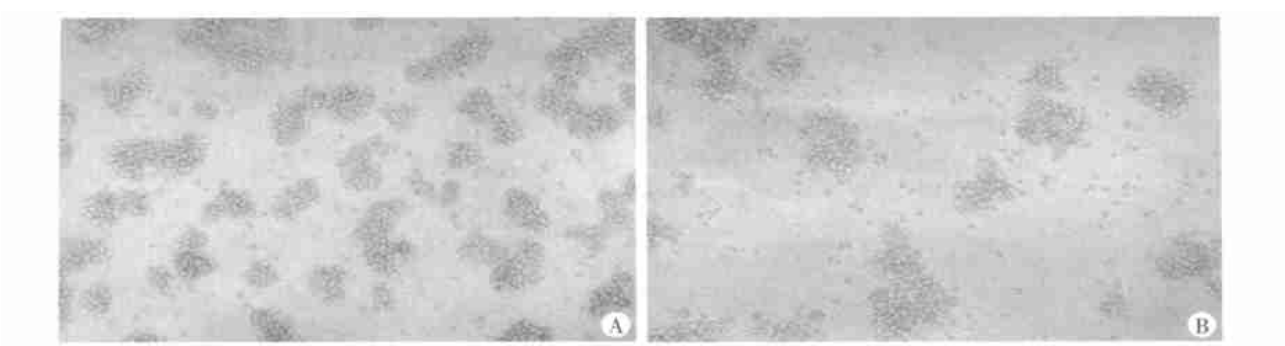


图1 粒单系祖细胞集落 (×50)

Fig 1 CFU-GM (×50)

A: Control; B: Burn+LPS group 1 d, significant reduction of the number of CFU-GM

2.3 TGF-β_1免疫组织化学染色结果

烧注后3、6 h可见少量阳性细胞(+)，12 h阳性细胞数增多(++)，1、3 d阳性细胞数明显增多(++)，见图2，5、7 d可见少量阳性细胞(+)。单烧1、3 d阳性细胞数较多(++)，其余各时相点见少量阳性细胞(+)。单注后1 d可见较多阳性细胞(++)，其余各时点阳性细胞较少(+)。正常对照组偶见TGF-β_1阳性细胞。

2.4 c-kit免疫组织化学染色结果

正常对照组c-kit呈阳性表达，阳性产物位于骨髓细胞膜，阳性细胞数较多(++)。烧注后12 h c-kit阳性细胞数有所减少(++)，1、3 d阳性细胞数明显减少(+)，见图3A、B，5 d阳性细胞数有所回升(++)，7 d可见较多的阳性细胞(++)。单烧后12 h阳性细胞数较正常对照组减少(++)，伤后1、3 d进一步减少(+)，5、7 d阳性细胞数与正常对照相近(++)。单注后1、3 d c-kit阳性细胞数较正常对照组少(++)，其余各时相点变化不明显。骨髓细胞内c-kit表达变化与CFU-GM变化趋势基本一致，而与TGF-β_1变化趋势相反。

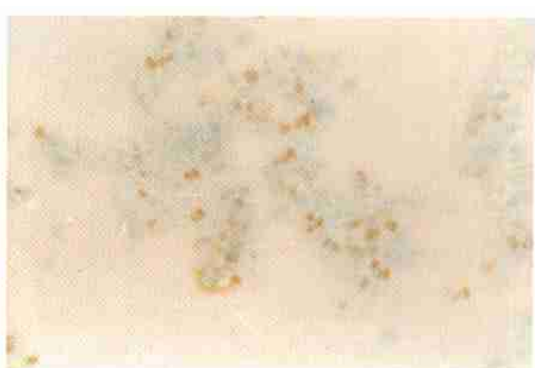


图2 烧注组1 d，骨髓细胞TGF-β_1蛋白呈胞浆阳性，阳性细胞数明显增多(++) (S-P×400)

Fig 2 The positive product of TGF-β_1 protein localized in the plasma of BMNC and significant increased of the number of positive BMNC (++) at the 1st day after burns combined with LPS injection (S-P×400)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

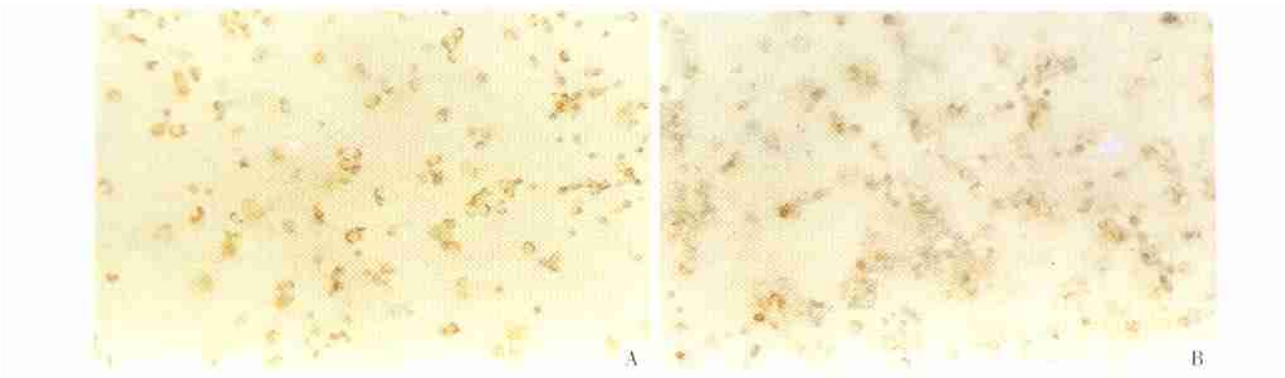


图 3　骨髓细胞 c-kit 蛋白呈胞膜阳性表达　(S-P×200)

Fig 3　The positive product of c-kit protein localized in the membrane of BMNC　(S-P× 200)

A: Control, a number of positive BMNC were observed (++); B: Burn+LPS group 3 d, significant reduction of the number of positive BMNC (+)

3　讨论

临床上, 严重烧伤病人常因多种原因合并内毒素血症, 是引起全身炎症反应综合征(SIRS)和多器官功能障碍(MODS)的重要原因之一[3]。骨髓粒单系造血功能的改变是烧伤后机体反应的重要病理改变这一。近年来对烧伤后外周血 WBC 数量和功能的变化研究较多, 而对造血干/祖细胞增殖、分化和调控研究较少, 且由于研究对象和方法的不同所报道的结果不尽一致。本研究从 WBC 生成的角度探讨了机体免疫功能受损的机制。结果发现烧伤合并内毒素注射后 12 h 内外周血 WBC 升高, 这可能与烧注后 LPS 和 PAF 等刺激单核-巨噬细胞分泌集落刺激因子(CSF)增多从而加快骨髓造血细胞增殖, 骨髓贮备池和外周血边缘池释放增多、中性粒细胞凋亡被抑制及血液浓缩等多种因素有关[4]。而后期持续低于正常水平则主要与粒单系祖细胞(CFU-GM)增殖、分化及成熟受阻有关[5,6]。

TGF-β1 是广泛存在于体内的具有强大生物学活性的多效细胞因子, 对原始造血干/祖细胞和各系定向祖细胞都有显著抑制作用, 其作用是直接的、可逆的、呈剂量依赖性。TGF-β1 也存在于骨髓和胚胎造血部位, 它可由造血微环境中的基质成份和造血祖细胞产生[7]。本实验用免疫组化法检测了烧伤合并内毒素注射后骨髓细胞 TGF-β1 表达, 结果发现烧注后 1、3 d TGF-β1 阳性细胞数明显增多, 且骨髓细胞 TGF-β1 表达强度与骨髓 CFU-GM 变化趋势相反, 提示 TGF-β1 在烧注后粒单系造血抑制中起着重要作用。Bruno 等[8]发现 TGF-β1 抑制人纯化 $CD34^+$ 细胞及骨髓粒单系祖细胞的生长, 其抑制作用与 TGF-β1 下游分子 Smad5 信号转导有关, Smad5 反义寡核苷酸可干扰 TGF-β1 的信号转导, 使 TGF-β1 的抑制作用减弱。Weekx 等[9]发现 TGF-β1 明显抑制骨髓来源的 $CD34^{++}CD38^-$ 原始造血祖细胞增殖, 而用 TGF-β1 抗体中和内源性 TGF-β1 后, $CD34^{++}CD38^-$ 细胞对造血刺激因子的反应性增高。

关于 TGF-β1 参与造血抑制的机制, 目前尚未完全阐明。本实验结果显示与下调骨髓细胞干细胞因子受体(c-kit, CD117)表达有关。干细胞因子(SCF)又称肥大细胞生长因子(MGF) kit 配体(KL)或 Steel 因子(SF), 最初是 Zsebo 等[10]从 Buffalo 大鼠肝细胞系中 cDNA 克隆成功。SCF 受体即是 c-kit, 在小鼠编码于 5 号染色体 W 位点[11], 如该位点发生突变, 将会引起多潜能造血干细胞减少、贫血等。c-kit/SCF 信号传导途径在多种造血细胞增殖和分化中起重要作用。本实验用免疫组化法检测了骨髓细胞 c-kit 表达情况, 结果发现各实验组伤后 1、3 d 表达明显减少, 以烧注组最为显著, 且骨髓细胞表面 c-kit 表达在时间和强度上与 CFU-GM 变化呈较为一致的趋势, 而与 TGF-β1 表达变化趋势相反, 提示 c-kit 表达减少在烧注后骨髓粒单系抑制中起重要作用, 并且其表达下调可能是因为 TGF-β1 表达增强所致。文献[12]报道TGF-β1体外可迅速下调细胞膜 c-kit 的表达, 致使 50%的 $c\text{-}kit^+lin^-$ 骨髓细胞不再表达可检测到的 c-kit 受体, 这种抑制作用呈剂量和时间依赖性。Lu 等[13]也证实 TGF-β1 能抑制人脐血 $CD34^+$ 细胞增殖, 但用编码有人 c-kit cDNA 的逆转录病毒转染人脐血 $CD34^+$ 细胞后, TGF-β1 的抑制作用明显减弱, 间接反映 TGF-β1 是通过下调 c-kit 表达发挥造血抑制作用。此外, TGF-β1 还可下调细胞表面 IL-1受体及集落刺激因子(CSF)受体的表达[14]。当 TGF-β1下调生长因子受体达到阈值水平以下可使干/祖细胞处于无反应或低反应状态。

参考文献:

[1] 魏　泓, 主编. 医学实验动物学[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1998. 389－392.

[2] 葛忠良, 杨景山, 主编. 医学细胞化学与细胞生物学技术[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1992. 305－315.

[3] Yao Y M, Sheng Z Y, Tian H M, *et al*. The association of circulating endotoxemia with the development of multiple organ failure in burned patients [J]. Burns, 1995, 21(4): 255－258.

[4] Chitnis D, Dickerson C, Munster A M, *et al*. Inhibition of apoptosis in

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

polymorphonuclear neutrophils from burn patients[J]. J Leukoc Biol, 1996, 59(6): 835—839.
[5] Gamelli R L, He L K, Liu H, *et al*. Burn wound infection-induced myeloid suppression, the role of prostaglandin E2, elevated adenylate cyclase, and cyclic adentsine monophosphate[J]. J Trauma, 1998, 44(3): 469—474.
[6] Shoup M, Weisenberger J M, Wang J L, *et al*. Mechanisms of neutropenia involving myeloid maturation arrest in burn sepsis[J]. Ann Surg, 1998, 228(1): 112—122.
[7] Miller K L, Carlino J A, Ogawa Y, *et al*. Alterations in erythropoiesis in TGF-beta 1-treated mice[J]. Exp Hematol, 1992, 20(8): 951—956.
[8] Bruno E, Horrigan S K, Van Den B D, *et al*. The Smad 5 gene is involved in the intracellular signaling pathways that mediate the inhibitory effects of transforming growth factor-β on human hematopoiesis[J]. Blood, 1998, 91(6): 1 917—1 923.
[9] Weekx S F, Plum J, Van-cauwelaert P, *et al*. Developmentally regulated responsiveness to transforming growth factor-beta is correlated with functional differences between human adult and fetal primitive hematopoietic progenitor cells[J]. Leukemia, 1999, 13(8): 1 266—1 272.
[10] Zsebo K M, Wypych J, McNiece I K, *et al*. Identification, purification, and biological characterization of hematopoietic stem cell factor from buffalo rat liver-conditioned medium[J]. Cell, 1990, 63(1): 195—201.
[11] Chabot B, Stephenson D A, Chapman V M, *et al*. The proto-oncogene c-kit encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse W locus[J]. Nature, 1988, 335(6 185): 88—89.
[12] Dubois C M, Ruscetti F W, Stankova J, *et al*: Transforming growth factor-β regulates c-kit message stablity and cell-surface protein expression in hematopoietic progenitors[J]. Blood, 1994, 83(11): 3 138—3 145.
[13] Lu L, Heinrich M C, Wang L S, *et al*. Retroviral-mediated gene transduction of c-kit into single hematopoietic progenitor cells from cord blood enhances erythroid colony formation and decreases sensitivity to inhibition by tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta 1[J]. Blood, 1999, 94(7): 2 319—2 332.
[14] Jacobsen S E, Ruscetti F W, Dubois C M, *et al*. Transforming growth factor-beta trans-modulates the expression of colony stimulating factor receptors on murine hematopoietic progenitor cell lines[J]. Blood, 1991, 77(8): 1 706—1 716.

（编辑 郭建秀）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2001)10-1160-01

肝硬化门脉高压患者检测血清透明质酸的临床意义

Clinical value of serum hyalurouic acid in hepatic cirrhosis patients with portal hypertension

刘明涛，刘海峰，房殿春 （第三军医大学附属西南医院全军消化专科中心，重庆 400038）

本研究通过对肝硬化门静脉高压患者血清透明质酸(Hyaluronic acid, HA)浓度的检测，观察门静脉高压的程度，并同时观察 HA 与肝功能(Child-Pugh 分级)变化的关系，旨在探讨肝硬化门脉高压患者 HA 检测的临床价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料

89 例肝硬化患者均为我院 2000-01—2000-07 间住院患者，男 73 例，女 16 例，年龄 21～68 岁。上述患者均根据病史、肝功能、乙肝病毒标志物、B 超、CT 或内镜等确诊，其中肝炎后肝硬化 87 例，酒精性肝硬化 2 例，根据门静脉增宽程度分为两组，即＜1.5(1.26±0.15) cm 42 例组和≥1.5(1.57±0.12) cm 47 例组。对照组(非肝病组)20 例，男 13 例，女 7 例，年龄 22～62 岁。

1.2 方法

1.2.1 受试患者均空腹抽血测定血清 HA，HA 的定量测定采用放射免疫测定法(^{125}I-HABP)，药盒由上海海军医学研究所提供，同时常规检测肝功能，并进行 Child-Pugh 分级，根据积分分为 A、B、C 3 级。

1.2.2 对受试患者采用 Askson128 型超声显象仪，探头频率3.5 MHz，进行检查，详细记录门静脉宽度。

2 结果

所测血清 HA 情况见表 1。≥1.5 cm 组门静脉增宽程度与血清 HA 升高有显著的相关性，r=0.4331，P＜0.01，提示相关性较好。

表 1 血清 HA 与门静脉宽度的关系

组别	n	血清 HA(ng/ml)
对照组	20	57.35±27.21
＜1.5 cm 组	42	356.77±252.63[a]
≥1.5 cm 组	47	1 113.19±486.68[ab]

a: P＜0.001 与对照组比较；b: P＜0.001 与＜1.5 cm 组比较

血清 HA 与肝功能的关系：本组 89 例肝硬化患者血清 HA 浓度变化与肝功能分级的关系见表 2。血清 HA 浓度随 Child-Pugh 积分的增加而增加，各组之间均具有显著差异性，并与肝功能损害程度呈正相关。

Child-Pugh 分级与门脉增宽的关系：本组 89 例肝硬化患者按 Child-Pugh 积分法分为 A 级 21 例，门脉宽度＜1.5 cm，占 90.48%，门脉宽度≥1.5 cm，9.25%；B 级 39 例，门脉宽度＜1.5 cm，占 43.59%，门脉宽度≥1.5 cm，56.41%；C 级，29 例门脉宽度＜1.5 cm，占 20.69%，门脉宽度≥1.5 cm，79.31%；随着肝功能 Child-Pugh 积分增加，肝硬患者门静脉宽度≥1.5 cm 的比例

（下转 1166 页）

作者简介：刘明涛(1964—)，男，重庆市人，主治医师，主要从事消化内科方面的研究，现在重庆市渝北区人民医院内二科，重庆 401120。电话：(023)67802356

收稿日期：2000-10-20；修回日期：2001-03-28

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net