

· 论著 ·

红细胞膜磷脂酰丝氨酸外露在脓毒症患者贫血发生中的意义

石斌 马国光 刘鸿翔 刘景全 杨婉花 张宏泽 王晶 万晟霞

【摘要】 目的 探讨红细胞膜表面磷脂酰丝氨酸(PS)外露在脓毒症患者贫血发生中的意义。方法 采用自身前后对照研究方法,选择 30 例重症监护病房(ICU)脓毒症患者,分别在入 ICU 1 d、7 d 时采集外周静脉血,常规测定血红蛋白(Hb);采用膜联蛋白 V/碘化丙啶(Annexin V/PI)染色方法,用流式细胞仪测定外周血中 PS 外露红细胞所占比例,分析 Hb 水平与 PS 外露红细胞比例之间的相关性。结果 30 例脓毒症患者入 ICU 7 d 时的 Hb 水平较 1 d 时显著下降($g/L: 81.59 \pm 3.31$ 比 121.90 ± 3.34 , $t=8.570$, $P=0.000$),外周血中 PS 外露的红细胞比例也明显高于 1 d 时[(17.19 ± 1.35)% 比 (7.87 ± 0.83)%, $t=-6.557$, $P=0.000$];Pearson 直线相关分析显示,PS 外露红细胞比例与 Hb 水平呈显著负相关($r=-0.838$, $P=0.000$)。结论 外周血 PS 外露的红细胞在脓毒症患者中明显增加,且与患者贫血程度有关,贫血程度越严重,红细胞 PS 外露水平越高。

【关键词】 脓毒症; 红细胞; 磷脂酰丝氨酸; 贫血

Significance of erythrocytes phosphatidylserine exposure on occurrence of anemia in sepsis SHI Bin*, MA Guo-guang, LIU Hong-xiang, LIU Jing-quan, YANG Wan-hua, ZHANG Hong-ze, WANG Jing, WAN Sheng-xia. Department of Emergency Critical Care Medicine, Shanghai Songjiang Center Hospital, Shanghai 201600, China. Corresponding author: SHI Bin, Email: joysb1969@sina.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the role of phosphatidylserine (PS) exposure of erythrocytes in the development of anemia in sepsis patients. **Methods** A self-control study was conducted. Thirty sepsis patients admitted to intensive care unit (ICU) were enrolled. Peripheral venous blood was collected on 1 day and 7 days after ICU admission, and hemoglobin (Hb) concentration was examined routinely. A flow-cytometric assay based on Annexin V/propidium iodide (Annexin V/PI) was used to measure the PS exposure of erythrocytes. The relationship between PS exposure and Hb concentration was analyzed. **Results** Hb concentrations in 30 sepsis patients at 7 days after ICU admission were significantly decreased compared with those of patients at 1 day ($g/L: 81.59 \pm 3.31$ vs. 121.90 ± 3.34 , $t=8.570$, $P=0.000$), but the percentage of PS exposure of erythrocytes was significantly higher [(17.19 ± 1.35)% vs. (7.87 ± 0.83)%, $t=-6.557$, $P=0.000$]. An inverse correlation was found between percentage of PS-positive RBCs and Hb concentration by Pearson analysis ($r=-0.838$, $P=0.000$). **Conclusions** The percentage of PS exposure in erythrocytes is significantly increased in sepsis, and it might contribute to the development of anemia in sepsis patients during hospital stay. The more severe the anemia, the higher the PS in erythrocytes.

【Key words】 Sepsis; Erythrocytes; Phosphatidylserine; Anemia

贫血在脓毒症(sepsis)患者中是个很常见的问题。研究表明,入住重症监护病房(ICU)3 d 后 95% 的患者会出现血红蛋白(Hb)不同程度的下降^[1],住院超过 7 d 的 ICU 患者中更是有 85% 接受过至少 1 U 的红细胞输注^[2]。目前认为导致脓毒症患者贫血的原因包括血液丢失过多、营养缺乏、促红细胞生成素(EPO)反应迟缓、铁代谢异常等^[3]。但是针对这些原因采取的治疗措施并不能很好地纠正脓毒症贫血的发生。近来研究发现,在某些病理情况下(如尿毒症时),位于红细胞胞膜、胞质表面的磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)在体内外某些因素的刺激

下会翻转,外露表达于膜外,引起红细胞的异常改变,从而使巨噬细胞对这种不正常的红细胞识别、吞噬,最终引发贫血^[4]。但在脓毒症状态下,红细胞是否会发生 PS 外露引发贫血目前不得而知。本研究旨在通过测定脓毒症患者入 ICU 期间外周血中 PS 外露红细胞水平及其 Hb 浓度的变化,以进一步探讨脓毒症患者贫血发生的机制。

1 对象和方法

1.1 研究对象:采用自身前后对照研究方法,选择 2012 年 1 月至 12 月收治于上海市松江区中心医院 ICU 的脓毒症患者 30 例。

1.1.1 入选标准:脓毒症诊断符合 2008 年拯救脓毒症运动指南推荐的标准^[5]。①感染:痰液、血液、尿液或腹腔、胸腔引流液微生物培养阳性;②全身炎症反应综合征(SIRS):体温 $>38\text{ }^{\circ}\text{C}$ 或 $<36\text{ }^{\circ}\text{C}$;心率 $>$

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2013.10.009

基金项目:上海市松江区医药卫生医学领先专业项目(2012-III-05)

作者单位:201600 上海市松江区中心医院急诊危重病科

通信作者:石斌,Email: joysb1969@sina.com

90 次/min; 呼吸频率 > 20 次/min 或动脉血二氧化碳分压 (PaCO_2) < 32 mm Hg (1 mm Hg = 0.133 kPa); 外周血白细胞计数 > $12 \times 10^9/\text{L}$ 或 < $4 \times 10^9/\text{L}$ 。

1.1.2 排除标准: 铁、叶酸、维生素 B12 等缺乏所致的贫血患者; 慢性肾病所致肾性贫血者; 有 EPO 治疗史者, 因 EPO 可结合红细胞, 并抑制容量敏感的红细胞阳离子通道, 下调 PS 的外露表达^[6]; 住院期间进行血液透析 (血透) 治疗者, 研究证明血透可使红细胞 PS 外露增加^[7]; 近半年内有输血史者; 自动出院要求终止治疗者; 研究期间死亡的患者。

本研究符合医学伦理学标准, 经医院伦理委员会批准, 所有入选患者或委托人均知情同意。

1.2 检测指标及方法: 脓毒症患者入住 ICU 1 d 内采集外周静脉血 5 mL, 其中 1 mL 用于测定红细胞膜 PS 外露水平, 其余静脉血用于血常规分析测定 Hb 水平; 于入 ICU 7 d 时再次检测上述指标。采用膜联蛋白 V / 碘化丙啶 (Annexin V / PI) 染色方法, 用流式细胞仪检测红细胞膜 PS 外露表达阳性率, 试剂盒由瑞士 Roche 公司提供。流式细胞仪检测时激发波长 (Ex) 488 nm、发射波长 (Em) 530 nm, 通过仪器自带软件自动计算 Annexin V 阳性的红细胞比例及平均荧光强度, 该方法的变异系数是 5%。

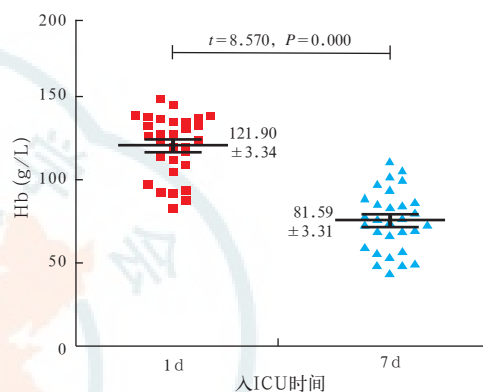
1.3 统计学方法: 应用 SPSS 17.0 统计软件, 计量资料采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析和 t 检验进行比较; 相关性检验采用 Pearson 相关分析; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者的基本临床资料: 共入选 30 例脓毒症患者, 男性 17 例, 女性 13 例; 年龄 27 ~ 83 岁, 平均 (61.3 ± 17.6) 岁。外科术后合并感染 9 例, 慢性阻塞性肺疾病急性加重期 (AECOPD) 合并肺部感染 7 例, 脑卒中合并肺部、泌尿道感染 3 例, 多发伤合并感染 5 例, 重症肺炎 4 例, 急性坏死性胰腺炎

2 例。感染部位 (包括 1 个或以上): 肺部感染及胸腔感染 16 例, 血流感染 3 例, 腹腔感染 8 例, 外科手术部位感染 9 例, 泌尿系感染 4 例; 革兰阳性菌感染 14 例, 革兰阴性菌感染 9 例, 真菌感染 3 例, 混合细菌感染 4 例。患者平均急性生理学及慢性健康状况评分系统 II (APACHE II) 评分 (18.2 ± 6.6) 分。

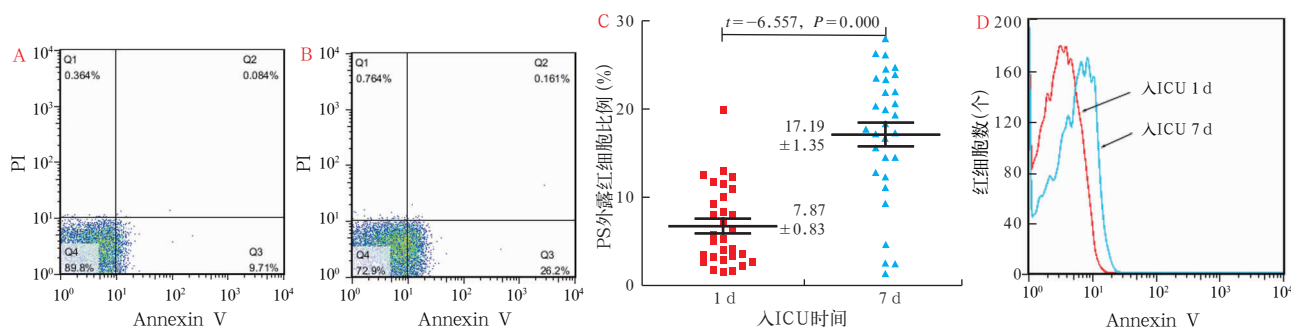
2.2 脓毒症患者入 ICU 后 Hb 的变化 (图 1): 脓毒症患者入 ICU 7 d 时 Hb 水平显著低于 1 d 时, 差异有统计学意义 ($t = 8.570, P = 0.000$)。



注: ICU 为重症监护病房, Hb 为血红蛋白

图 1 30 例脓毒症患者入 ICU 1 d、7 d 时 Hb 浓度的变化

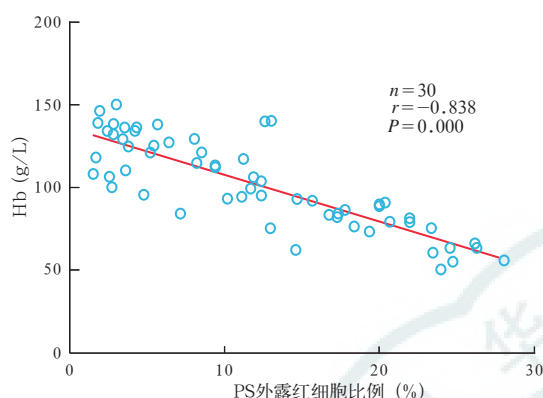
2.3 脓毒症患者外周血中 PS 外露红细胞的结果分析: 流式细胞仪检测结果如图 2A、B 所示, Q1 区代表 PI 透过胞膜的坏死细胞; Q3 区代表与 Annexin V 特异结合表达 PS 的红细胞; Q4 区代表正常细胞。从 Annexin V / PI 荧光双参数点图 Q3 区中观察到, 脓毒症患者入 ICU 7 d 时 PS 外露红细胞的比例 (图 2B) 明显高于入 ICU 1 d 时 (图 2A), 而且差异有统计学意义 [$(17.19 \pm 1.35)\%$ 比 $(7.87 \pm 0.83)\%$, $t = -6.557, P = 0.000$; 图 2C)。同时, 对 Annexin V 荧光峰值图 (图 2D) 分析结果也表明, 脓毒症患者入 ICU 7 d 时与 Annexin V 结合的红细胞数目明显高于入 ICU 1 d 时。



注: ICU 为重症监护病房, Annexin V 为膜联蛋白 V, PI 为碘化丙啶, PS 为磷脂酰丝氨酸

图 2 流式细胞仪检测脓毒症患者入 ICU 1 d (A)、7 d (B) 时外周血红细胞 Annexin V / PI 荧光双参数点图及 PS 外露红细胞的比率 (C); Annexin V 荧光峰值图显示 1 d 和 7 d Annexin V 结合的红细胞数目 (D)

2.4 PS 外露红细胞比例与 Hb 水平的相关性分析 (图 3): Pearson 直线相关分析结果显示, PS 外露的红细胞比例与 Hb 水平呈显著负相关 ($r=-0.838$, $P=0.000$), 说明脓毒症患者 Hb 水平越低(贫血程度越严重), 红细胞 PS 外露水平越高。



注: PS 为磷脂酰丝氨酸, Hb 为血红蛋白

图 4 30 例脓毒症患者 PS 外露红细胞比例与 Hb 水平的 Pearson 直线相关分析

3 讨论

真核细胞膜表面存在磷脂的不对称性分布, 膜外层主要分布有胆碱类的磷脂(如鞘磷脂和磷脂酰胆碱等), 膜内层主要分布有氨基磷脂(如 PS 和磷脂酰乙醇胺等), 这是保证细胞正常存活的决定性因素^[8]。膜磷脂不对称性分布的改变对于细胞之间的相互作用、信号转导、细胞代谢等有重要的意义。其中 PS 外露便是细胞膜不对称性分布改变的典型表现之一, 同时也是细胞凋亡、吞噬细胞识别的重要信号^[9]。细胞凋亡是有核细胞内基因控制的细胞自主有序的死亡过程, 其典型表现为细胞膜内侧 PS 外露到膜表面, 体积缩小, 核质浓缩、降解等, 并形成凋亡小体被周围专职或非专职的吞噬细胞所吞噬。而细胞衰老是细胞在正常生理条件下发生的细胞各项功能的衰退、细胞形态的显著变化并最终趋向死亡的现象, 其表现有细胞膜的流动性降低、通透性增加, 质膜皱缩, 核增大、染色质凝聚等, 但衰老的细胞不会出现膜 PS 的翻转外露。因此, 膜内侧 PS 翻转外露是区别细胞凋亡与衰老的主要特征^[9]。

健康人循环血中红细胞的寿命是 120 d 左右, 达到寿命的衰老红细胞会滞留于脾和骨髓中被巨噬细胞吞噬而结束寿命^[10], 这是正常红细胞衰老死亡的过程。然而, 最近的研究发现, 内源性异常介质紊乱或外源物质侵入血液后, 某些损害会致使红细胞在正常寿命衰老之前发生自杀性死亡^[11]。还有研究发现, 循环血中成熟红细胞在高渗状态、氯离子缺

乏、氧化应激、抗原抗体刺激、能量耗竭等因素的刺激下, 会出现类似有核细胞凋亡的现象, 表现为 PS 外露到红细胞膜表面、细胞皱缩体积变小、细胞囊泡化等, 但成熟红细胞内不含细胞核和线粒体, 这种死亡与有核细胞凋亡可能完全不同, 因此 Lang 等^[4,12]将这种现象称为红细胞衰亡。

有证据表明, 炎症细胞因子如肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和 γ -干扰素可增加 T 淋巴细胞膜 PS 外露, 促使其凋亡, 缩短 T 淋巴细胞寿命, 减少 T 淋巴细胞数量^[13]。在创伤、大手术后的休克状态下, 肠道内细菌、大量免疫激活及炎症促发等是导致红细胞膜泵活性降低、红细胞代谢紊乱及红细胞结构破坏的重要因素^[14-15]。Lucchi 等^[16]亦发现, 炎症反应下的氧化应激可导致红细胞脂质过氧化反应, 红细胞被巨噬细胞吞噬的作用明显增强。Siems 等^[17]发现, 作为氧化应激评定指标的血清中脂质过氧化产物丙二醛(MDA)与贫血之间有密切的相关性, 血透患者血清中 MDA 浓度越高, 贫血程度越严重。另有研究显示, 尿毒症、慢性肾功能衰竭(肾衰)、腹膜透析患者中普遍存在红细胞膜 PS 外露明显增加, 而且与贫血程度相关^[18-20]。慢性肾衰时, 过度的氧化应激会导致红细胞膜 PS 外露水平的增加^[16,21]。尿毒症贫血患者中巨噬细胞对 PS 外露红细胞的吞噬作用是其对正常红细胞作用的 3 倍, 如果将正常红细胞与尿毒症患者血浆一起孵育, 红细胞 PS 的外露明显增加, PS 外露正是红细胞衰亡的形态改变之一^[20]。上述研究提示, 血浆环境变化、炎症介质增加、应激反应与红细胞衰亡及贫血之间可能存在某种必然的关系。

脓毒症是一种代偿性抗炎反应综合征(CARS), 表现为血浆中促炎/抗炎细胞因子的失衡, 炎症细胞因子、氧化应激产物和血管活性介质的大量生成及内环境紊乱^[22-23]等血浆环境的改变是否会对红细胞形态与结构、红细胞衰亡产生影响, 以及红细胞衰亡与脓毒症贫血发生的关系如何值得探讨。本研究显示, 脓毒症患者入 ICU 7 d 时外周血中 PS 外露的红细胞比例明显高于 1 d 时, 同时伴随 PS 外露红细胞的增多, Hb 出现显著下降; 相关性分析发现, PS 外露红细胞的多少与患者贫血程度呈负相关, 提示在脓毒症状态下, 随着病情的进展和贫血的加重, 红细胞 PS 外露水平增加, 说明红细胞衰亡可能参与了脓毒症贫血的发生发展过程。

目前研究认为, 红细胞在高渗或氧化应激等刺激下, 会激活环氧合酶(COX), 进一步由磷脂酶 A₂ (PLA₂)降解膜磷脂合成前列腺素 E₂ (PGE₂), 同时也

引发血小板活化因子(PAF)的合成。红细胞衰亡的信号途径主要包括以下两个方面:①PGE₂导致的红细胞膜 Ca²⁺ 通道激活途径^[24];②PAF 激活鞘磷脂酶(sphingomyelinase)途径^[25]。PGE₂ 作用于红细胞,激活红细胞膜上的 Ca²⁺ 通道,导致细胞内 Ca²⁺ 浓度增加;PAF 同时激活鞘磷脂酶导致鞘磷脂的降解,从红细胞中释放神经酰胺。胞质内 Ca²⁺ 浓度的增加和神经酰胺会进一步激活红细胞膜上的混转酶(scramblase)、Ca²⁺ 依赖的半胱氨酸内肽酶——钙蛋白酶和其他的离子通道,将细胞膜内部的 PS 转移到红细胞表面,并促使大量的胞内 KCl 外流,同时引发细胞膜囊泡化、细胞皱缩、细胞骨架蛋白降解等一系列形态改变。此时,循环中的巨噬细胞通过相关受体识别暴露于红细胞表面的 PS,并很快将其吞噬降解,从循环血液中清除,避免了溶血反应的发生^[26-27]。因此,暴露 PS 的红细胞会被循环中巨噬细胞识别,并吞噬降解,最终清除。过度的红细胞衰亡会引起循环血中红细胞清除的增加,并导致贫血的发生。

综上所述,本研究结果显示,外周血中成熟红细胞膜 PS 外露所致的红细胞清除增加可能参与了脓毒症贫血的发生过程,红细胞衰亡可能在脓毒症贫血发生发展中发挥着重要作用,提示抑制红细胞衰亡途径对治疗脓毒症具有潜在的临床诊疗价值。但有关红细胞衰亡在脓毒症贫血中的具体作用,以及红细胞衰亡与脓毒症炎症反应的关系等机制,尚待进一步的研究证实。

参考文献

- [1] Corwin HL, Krantz SB. Anemia of the critically ill: "acute" anemia of chronic disease. *Crit Care Med*, 2000, 28:3098-3099.
- [2] Vincent JL, Piagnerelli M. Transfusion in the intensive care unit. *Crit Care Med*, 2006, 34:S96-101.
- [3] van de Wiel A. Anemia in critically ill patients. *Eur J Intern Med*, 2004, 15:481-486.
- [4] Lang KS, Lang PA, Bauer C, et al. Mechanisms of suicidal erythrocyte death. *Cell Physiol Biochem*, 2005, 15:195-202.
- [5] Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock; 2008. *Crit Care Med*, 2008, 36:296-327.
- [6] Grimm C, Wenzel A, Groszer M, et al. HIF-1-induced erythropoietin in the hypoxic retina protects against light-induced retinal degeneration. *Nat Med*, 2002, 8:718-724.
- [7] Bonomini M, Siroli V, Settefrati N, et al. Increased erythrocyte phosphatidylserine exposure in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol*, 1999, 10:1982-1990.
- [8] van Engeland M, Nieland LJ, Ramaekers FC, et al. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*, 1998, 31:1-9.
- [9] Lauber K, Blumenthal SG, Waibel M, et al. Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses. *Mol Cell*, 2004, 14:277-287.
- [10] Arese P, Turrini F, Schwarzer E. Band 3/complement-mediated recognition and removal of normally senescent and pathological human erythrocytes. *Cell Physiol Biochem*, 2005, 16:133-146.
- [11] Lang F, Gulbins E, Lang PA, et al. Ceramide in suicidal death of erythrocytes. *Cell Physiol Biochem*, 2010, 26:21-28.
- [12] Lang F, Qadri SM. Mechanisms and significance of eryptosis, the suicidal death of erythrocytes. *Blood Purif*, 2012, 33:125-130.
- [13] Meier P, Dayer E, Blanc E, et al. Early T cell activation correlates with expression of apoptosis markers in patients with end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13:204-212.
- [14] 韩瑞, 李志鹏, 鲁蓓, 等. 休克肠淋巴液对大鼠红细胞膜泵活性及氧自由基的影响. *中国危重病急救医学*, 2011, 23:454-457.
- [15] 韩瑞, 杜会博, 鲁蓓, 等. 肠淋巴液引流改善失血性休克大鼠液体复苏后的红细胞代谢. *中国危重病急救医学*, 2012, 24:474-477.
- [16] Lucchi L, Bergamini S, Iannone A, et al. Erythrocyte susceptibility to oxidative stress in chronic renal failure patients under different substitutive treatments. *Artif Organs*, 2005, 29:67-72.
- [17] Siems W, Carluccio F, Radenkovic S, et al. Oxidative stress in renal anemia of hemodialysis patients is mitigated by epoetin treatment. *Kidney Blood Press Res*, 2005, 28:295-301.
- [18] Sakthivel R, Farooq SM, Kalaiselvi P, et al. Investigation on the early events of apoptosis in senescent erythrocytes with special emphasis on intracellular free calcium and loss of phospholipid asymmetry in chronic renal failure. *Clin Chim Acta*, 2007, 382:1-7.
- [19] Bi SH, Cheng LT, Wang T. The role of erythrocytes phosphatidylserine exposure in anemia in peritoneal dialysis patients. *Ren Fail*, 2006, 28:573-576.
- [20] Bonomini M, Siroli V, Reale M, et al. Involvement of phosphatidylserine exposure in the recognition and phagocytosis of uremic erythrocytes. *Am J Kidney Dis*, 2001, 37:807-814.
- [21] 孔庆瑜, 黄玉娟, 吴杏, 等. 慢性肾衰竭病人红细胞表面磷脂酰丝氨酸的表达. *中国病理生理杂志*, 2003, 19:498, 502.
- [22] Lyons J, Rauh-Pfeiffer A, Ming-Yu Y, et al. Cysteine metabolism and whole blood glutathione synthesis in septic pediatric patients. *Crit Care Med*, 2001, 29:870-877.
- [23] Takeda K, Shimada Y, Amano M, et al. Plasma lipid peroxides and alpha-tocopherol in critically ill patients. *Crit Care Med*, 1984, 12:957-959.
- [24] Lang PA, Kempe DS, Myssina S, et al. PGE₂ in the regulation of programmed erythrocyte death. *Cell Death Differ*, 2005, 12:415-428.
- [25] Lang PA, Kempe DS, Tanneur V, et al. Stimulation of erythrocyte ceramide formation by platelet-activating factor. *J Cell Sci*, 2005, 118:1233-1243.
- [26] Fadok VA, Bratton DL, Rose DM, et al. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature*, 2000, 405:85-90.
- [27] Boas FE, Forman L, Beutler E. Phosphatidylserine exposure and red cell viability in red cell aging and in hemolytic anemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95:3077-3081.

(收稿日期:2013-01-21)

(本文编辑:李银平)

欢迎订阅核心期刊《中国中西医结合急救杂志》

邮发代号:6-93, 全国邮局办理订阅手续

本刊社邮购电话:022-23197150 Email:cccm@em120.com