

研究论文

长期和短期限限制性束缚对小鼠造血干细胞的不同影响

马晨珂, 吴宪, 徐哲, 刘健, 张纪岩, 史套兴*

军事科学院军事医学研究院军事认知与脑科学研究所, 北京 100850

摘要: 慢性心理应激会导致机体多种功能紊乱, 其中包括免疫力下降。慢性心理应激能够负调节免疫系统, 但机制尚未完全阐明。免疫细胞, 包括髓系来源细胞, 由骨髓造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)分化而来, 在机体免疫中发挥重要作用。本实验采用短期高强度束缚和长期温和束缚慢性心理应激小鼠模型, 探讨不同限制性束缚模式对小鼠骨髓HSC和髓系来源细胞的影响。长期温和束缚模型中, 对小鼠连续束缚4周, 每天束缚2次, 每次束缚2 h (9:00到17:00间完成); 短期高强度束缚模型中, 小鼠连续束缚5天, 每天束缚16 h (当日17:00到次日9:00)。束缚完成后, 取小鼠骨髓和外周血进行白细胞计数, 流式细胞术检测小鼠骨髓HSC ($\text{Lin}^- \text{CD117}^+ \text{Sca1}^+ \text{CD150}^+ \text{CD48}^-$)和髓系细胞($\text{CD11b}^+ \text{Ly6C}^+$)的比例和绝对数, 以及外周骨髓系细胞的比例和绝对数, BrdU掺入实验检测小鼠HSC增殖能力。实验结果表明, 长期温和应激导致小鼠骨髓HSC的比例和绝对数增加, 而短期高强度应激导致小鼠骨髓HSC的绝对数下降, 伴有HSC的增殖下降。两种束缚模式都使小鼠骨髓和外周血 $\text{CD11b}^+ \text{Ly6C}^+$ 细胞的总数增加或呈现增加的趋势。综上所述, 长期温和应激和短期高强度应激对小鼠HSC的比例和绝对数影响不同; 两种应激模型都可以使 $\text{CD11b}^+ \text{Ly6C}^+$ 细胞总数增加, HSC增多可能并不是 $\text{CD11b}^+ \text{Ly6C}^+$ 细胞增多的主要机制。

关键词: 心理应激; 造血干细胞; 髓系细胞; 束缚应激模型

中图分类号: R392

Different effects of long-term and short-term repeated restraints on the hematopoietic stem cells in mice

MA Chen-Ke, WU Xian, XU Zhe, LIU Jian, ZHANG Ji-Yan, SHI Tao-Xing*

Institute of Military Cognition and Brain Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

Abstract: Humans with chronic psychological stress are prone to develop multiple disorders of body function including impairment of immune system. Chronic psychological stress has been reported to have negative effects on body immune system. However, the underlying mechanisms have not been clearly demonstrated. All immune cells are derived from hematopoietic stem cells (HSC) in the bone marrow, including myeloid cells which comprise the innate immunity as a pivotal component. In this study, to explore the effects of chronic psychological stress on HSC and myeloid cells, different repeated restraint sessions were applied, including long-term mild restraint in which mice were individually subjected to a 2 h restraint session twice daily (morning and afternoon/between 9:00 and 17:00) for 4 weeks, and short-term vigorous restraint in which mice were individually subjected to a 16 h restraint session (from 17:00 to 9:00 next day) for 5 days. At the end of restraint, mice were sacrificed and the total cell numbers in the bone marrow and peripheral blood were measured by cell counting. The proportions and absolute numbers of HSC ($\text{Lin}^- \text{CD117}^+ \text{Sca1}^+ \text{CD150}^+ \text{CD48}^-$) and myeloid cells ($\text{CD11b}^+ \text{Ly6C}^+$) were detected by fluorescence activated cell sorting (FACS) analysis. Proliferation of HSC was measured by BrdU incorporation assay. The results indicated that the absolute number of HSC was increased upon long-term mild restraint, but was decreased upon short-term vigorous restraint with impaired proliferation. Both long-term mild restraint and short-term vigorous restraint led to the accumulation of $\text{CD11b}^+ \text{Ly6C}^+$ cells in the bone marrow as well as in the peripheral blood, as indicated by the absolute cell numbers. Taken together, long-term chronic stress led to increased ratio and absolute number of HSC in mice, while

Received 2019-08-19 Accepted 2020-02-13

*Corresponding author. Tel: +86-10-66930383; E-mail: shitaoxing@sina.com

short-term stress had opposite effects, which suggests that stress-induced accumulation of CD11b⁺Ly6C⁺ myeloid cells might not result from increased number of HSC.

Key words: psychological stress; hematopoietic stem cells; myeloid cells; restraint stress model

有研究证实, 应激是导致心理问题产生的重要因素^[1, 2], 慢性心理应激已被证实负向作用于免疫系统^[3, 4], 然而相关机制还不清楚^[5]。束缚可导致小鼠产生应激反应, 被广泛用于建立小鼠心理应激模型^[2]。所有成熟血细胞都由骨髓中造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)分化而来, 白细胞在免疫应答过程中发挥重要作用^[6, 7]。有文献报道, 长期应激(4周)可活化小鼠骨髓中的HSC, 使其比例和数目均增加^[8, 9]。慢性心理应激状态使下丘脑-垂体-肾上腺(hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA)轴持续活化, 进而导致糖皮质激素和儿茶酚胺水平升高^[10-12], 机体向骨髓释放过量的去甲肾上腺素^[13], 并通过 β_3 肾上腺素受体信号通路降低趋化因子CXCL12水平, 促进HSC活化^[9]。有学者认为, 由于HSC的增加使得慢性心理应激状态下中性粒细胞和单核细胞等髓系来源细胞产出增多, 使整个机体在没有感染的情况下也处于一种炎症状态^[8, 9]。本研究采用短期高强度束缚和长期温和束缚慢性心理应激小鼠模型, 探讨不同限制性束缚模式对小鼠骨髓HSC和髓系来源细胞的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 实验用C57BL/6小鼠购自军事科学院军事医学研究院实验动物中心, 在SPF级动物房繁殖饲养, 均为6~8周龄, 所有动物实验操作均符合国际实验动物评估和管理委员会的标准和规定, 并获得军事科学院军事医学研究院伦理委员会批准。

1.1.2 实验试剂 FACS洗液: 含0.1%叠氮钠和2%胎牛血清的PBS; 抗小鼠CD150-PEcy7、CD48-BV421、BrdU-PE、CD117-PerCP、Sca1-APC、B220-FITC、CD3-FITC、Gr1-FITC、Ter119-FITC、CD4-FITC、CD5-FITC、CD8-FITC、CD11b-FITC和Ly6C-APC抗体均购自美国eBioscience公司。

1.1.3 实验设备 FACS Calibur型流式细胞仪(美国BD公司)。

1.2 方法

1.2.1 慢性束缚应激 根据实验设计, 6~8周龄

小鼠随机分为对照组和长期束缚组(每组3只小鼠), 以及对照组和短期束缚组(每组3~8只小鼠)。束缚方法: 束缚组每只小鼠束缚在规格相同的50 mL锥形离心管中, 锥形离心管提前在管壁上钻好孔, 以保持通风。长期束缚组连续束缚4周, 每天束缚2次, 每次束缚2 h(9:00到17:00间完成), 短期束缚组连续束缚5天, 每天束缚16 h(当日17:00到次日9:00), 在每个束缚循环之间清洁和消毒束缚管。小鼠可以在管子里移动, 但不能转身。对照组小鼠不束缚, 但在束缚组束缚期间同样禁食、禁水^[8]。

1.2.2 外周血和骨髓单细胞悬液制备

1.2.2.1 采样 小鼠脱颈处死, 固定四肢置于解剖板上, 喷洒75%酒精, 摘眼球取血后用含抗凝剂的离心管收集获得外周血。取出腿骨, 置于预冷的PBS中。

1.2.2.2 单细胞悬液制备 (1)外周血: 离心后用PBS重悬, 200目滤网过滤, 6 000 r/min、4 °C离心30 s, 弃上清, 加入1 mL红细胞裂解液, 室温静置5 min, 6 000 r/min、4 °C离心30 s, 弃上清, 加入1 mL预冷的PBS重悬备用。

(2)骨髓: 用注射器吸取预冷的PBS, 针尖插入骨髓中吹打骨髓, 细胞悬液储存在一个预冷的试管中, 2 000 r/min、4 °C离心5 min, 加入1 mL预冷的PBS, 转移到EP管中, 6 000 r/min、4 °C离心30 s, 弃上清, 加入1 mL预冷的PBS重悬备用。

1.2.2.3 细胞计数 用PBS将细胞悬液稀释100倍, 混匀后取10 μ L加入到计数板, 用低倍镜计数。四个大格总细胞数为N。细胞浓度 = (N/4 \times 106)/mL。

1.2.2.4 二次重悬 细胞悬液6 000 r/min、4 °C离心30 s, 根据实验目的, 用PBS或RPMI 1640培养基再次重悬细胞, 调整至合适浓度备用。

1.2.3 流式细胞术 单细胞悬浮在FACS洗液中, 在冰上与荧光标记抗体结合, 4 °C避光染色30 min, FACS洗液洗涤一次, 含有1% (W/V)多聚甲醛的PBS固定并在4 °C下避光保存, 并于一周内上FACS Calibur型流式细胞仪检测。使用多余的细胞设置裸细胞样品与不同荧光通道的单标样品管。

1.2.4 BrdU 掺入实验 每只小鼠腹腔注射 BrdU 1 mg (0.9% NaCl 溶解), 24 h 后将小鼠腿骨中的细胞取出 (冰上操作), 进行 HSC 表面标记染色, 方法同流式细胞术, 固定过夜后用 FACS 洗液洗涤一次, 用 PBST (Triton-X 100) 重悬, 冰上放置 2 min, 洗涤一次后再加入 300 μ L DNase I, 37 $^{\circ}$ C 放置 30 min, 洗涤, 之后加入 BrdU 荧光抗体, 4 $^{\circ}$ C 避光染色 30 min, FACS 洗液洗涤一次, 加入 200 μ L FACS 洗液重悬, 24 h 内使用 FACS Calibur 型流式细胞仪检测 BrdU 抗体掺入情况。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计学软件分析数据。计量资料数据以 mean \pm SD 示, 用 *t* 检验比较两组数据之间的差异, 用单因素方差分析确定各组间的显著性。P < 0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 长期慢性应激使小鼠骨髓HSC的比例和绝对数增加

为验证文献中长期束缚应激对小鼠 HSC 的影响^[14], 我们对对照组和长期束缚组小鼠骨髓中 HSC (Lin⁻Sca1⁺CD117⁺CD150⁺CD48⁻) 进行流式细胞术分析。结果显示, 与对照组相比, 连续束缚 4 周, 每

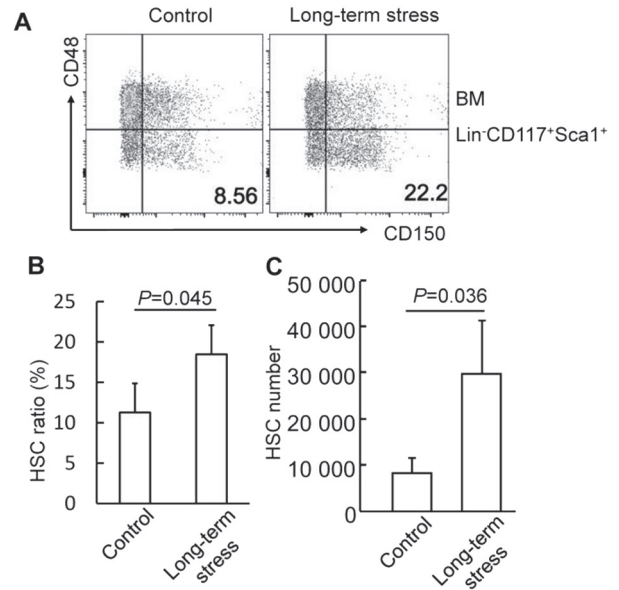


图 1. 长期慢性应激对小鼠骨髓造血干细胞比例和绝对数的影响

Fig. 1. Effects of long-term chronic stress on the ratio and number of hematopoietic stem cells (HSCs) in the bone marrow (BM) of C57BL/6 mice. BM mononuclear cells were subjected to flow cytometry for Lin (B220, Ter119, CD11b, Gr1, CD3, CD4, CD5, CD8), CD117, Sca1, CD150, and CD48 staining. A: Representative data. B: Ratio ($P = 0.045$). C: Absolute number ($P = 0.036$). Results are expressed as mean \pm SD, $n = 3$.

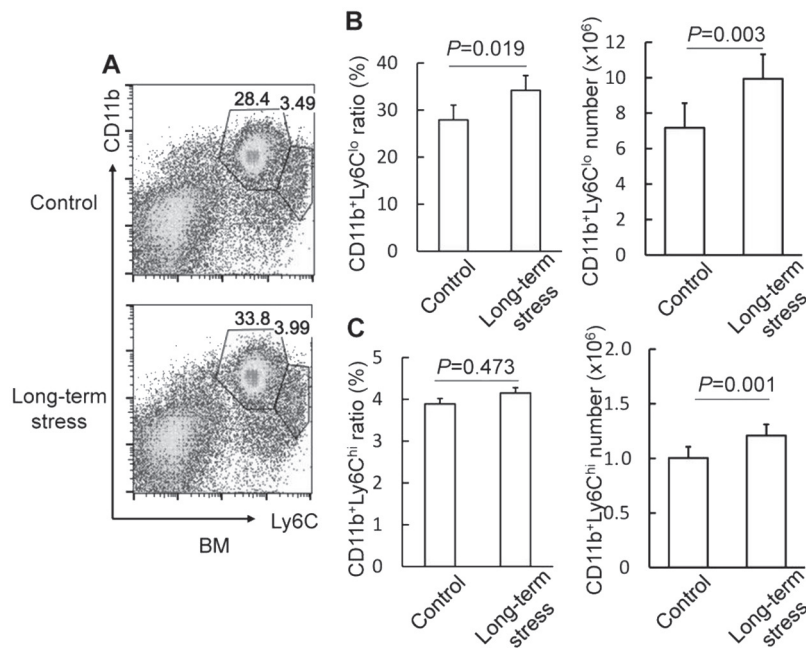


图 2. 长期慢性应激对小鼠骨髓CD11b⁺Ly6C⁺细胞比例和绝对数的影响

Fig. 2. Effects of long-term chronic stress on the ratio and number of myeloid CD11b⁺Ly6C⁺ cells in the bone marrow (BM) of C57BL/6 mice. BM mononuclear cells were subjected to flow cytometry for Ly6C and CD11b staining. A: Representative data. B: Ratio ($P = 0.019$) and absolute number ($P = 0.003$) of CD11b⁺Ly6C^{lo} cells. C: Ratio ($P = 0.473$) and absolute number ($P = 0.001$) of CD11b⁺Ly6C^{hi} cells. Results are expressed as mean \pm SD, $n = 3$.

天束缚 2 次, 每次束缚 2 h 的长期束缚组小鼠骨髓 HSC 的比例 ($P = 0.045$) 和绝对数 ($P = 0.036$) 均增加 (图 1)。因此, 长期慢性应激可以激活小鼠 HSC, 与文献报道^[14]一致。

2.2 长期慢性应激使小鼠骨髓髓系来源 CD11b⁺Ly6C⁺ 细胞的绝对数增加

为探讨慢性心理应激状态下 HSC 的增加是否是中粒细胞和单核细胞等髓系来源细胞产出增多的原因, 我们又研究了长期束缚应激对小鼠骨髓髓系来源 CD11b⁺Ly6C⁺ 细胞的影响。CD11b⁺Ly6C⁺ 细胞分为 CD11b⁺Ly6C^{lo} 和 CD11b⁺Ly6C^{hi} 两个亚群^[8,9]。流式细胞术结果显示, 与对照组相比, 经过长期束缚的小鼠骨髓中 CD11b⁺Ly6C^{lo} 细胞比例 ($P = 0.019$) 和绝对数 ($P = 0.003$) 均增加; CD11b⁺Ly6C^{hi} 细胞比例没有显著变化 ($P = 0.473$), 但其绝对数显著增加 ($P = 0.001$) (图 2)。

2.3 长期慢性应激使小鼠外周血 CD11b⁺Ly6C⁺ 细胞的绝对数呈现增加的趋势

长期束缚应激使小鼠骨髓髓系来源细胞产出增多, 为了探讨骨髓中 CD11b⁺Ly6C⁺ 细胞的紊乱是否存在于外周血, 我们又检测了外周血中 CD11b⁺Ly6C⁺ 细胞的变化。流式细胞术结果显示, 小鼠个体差异

较大, 与对照组相比, 经过长期束缚的小鼠外周血 CD11b⁺Ly6C^{lo} 细胞比例 ($P = 0.172$) 和绝对数 ($P = 0.078$) 呈现增加的趋势, 接近统计学意义; 而 CD11b⁺Ly6C^{hi} 细胞比例 ($P = 0.866$) 和绝对数 ($P = 0.389$) 的变化离统计学意义相差较远。因为长期慢性应激小鼠外周血 CD11b⁺Ly6C^{lo} 和 CD11b⁺Ly6C^{hi} 细胞的变化趋势不一致, 我们又计算了两个亚群的比例和绝对数之和, 发现 CD11b⁺Ly6C⁺ 细胞比例 ($P = 0.160$) 和绝对数 ($P = 0.055$) 呈现增加的趋势, 接近统计学意义 (图 3)。

2.4 短期应激使小鼠骨髓 HSC 的绝对数减少

前面研究结果显示, 长期慢性应激导致小鼠骨髓 HSC 和 CD11b⁺Ly6C⁺ 细胞数目增加, 外周血中 CD11b⁺Ly6C⁺ 细胞数量也呈现增加的趋势。为了探讨三者的相关性, 我们又研究了短期束缚应激对小鼠 HSC 的影响, 对对照组和短期束缚组小鼠骨髓进行流式细胞术分析, 结果显示, 与对照组相比, 连续束缚 5 天、每天 16 h 的短期束缚组小鼠 HSC 的比例并没有显著变化 ($P = 0.515$), 但其绝对数减少 ($P = 0.015$) (图 4)。

2.5 短期应激使小鼠骨髓 HSC 的增殖下降

短期束缚应激使小鼠 HSC 数目减少, 为研究

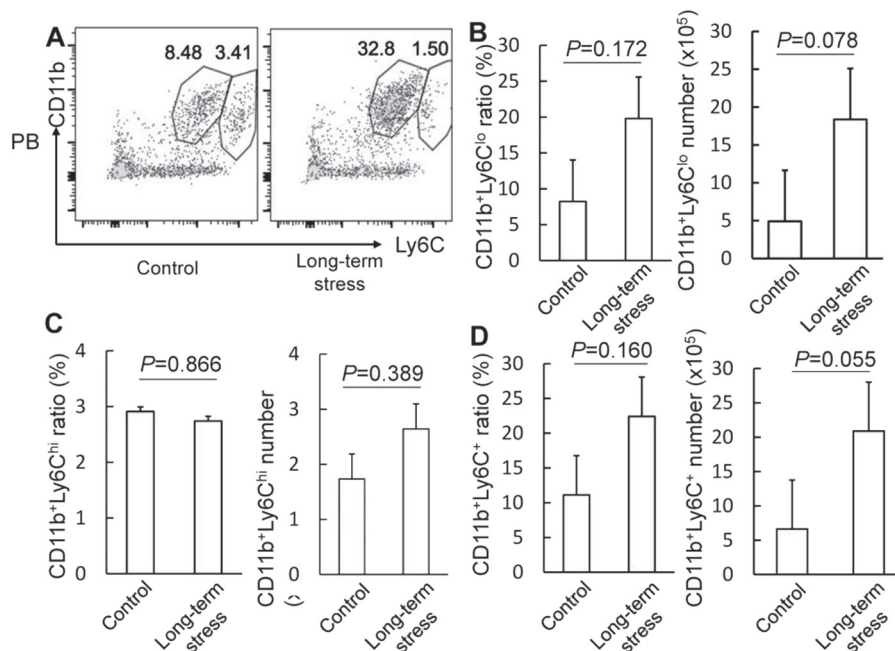


图 3. 长期慢性应激对小鼠外周血 CD11b⁺Ly6C⁺ 细胞比例和绝对数的影响

Fig. 3. Effects of long-term chronic stress on the ratio and number of CD11b⁺Ly6C⁺ cells in the peripheral blood of C57BL/6 mice. Peripheral blood cells were subjected to flow cytometry for Ly6C and CD11b staining. A: Representative data. B: Ratio ($P = 0.172$) and absolute number ($P = 0.078$) of CD11b⁺Ly6C^{lo} cells. C: Ratio ($P = 0.866$) and absolute number ($P = 0.389$) of CD11b⁺Ly6C^{hi} cells. D: Ratio ($P = 0.160$) and absolute number ($P = 0.055$) of CD11b⁺Ly6C⁺ cells. Results are expressed as mean ± SD, $n = 3$.

该现象是否与 HSC 的增殖有关，我们通过流式细胞术分析 HSC 的增殖 (Lin⁻Sca1⁺CD117⁺CD150⁺CD48⁻BrdU⁺) 情况，结果显示，与对照组相比，连续束缚 5 天、每天 16 h 的短期束缚组小鼠 HSC 的增殖百分比显著降低 ($P = 0.046$ ，图 5)，因此细胞增殖下

降可能是短期束缚应激使小鼠 HSC 数目减少的原因之一。

2.6 短期应激使小鼠骨髓CD11b⁺Ly6C⁺细胞的绝对数增加

如前所述，短期应激使小鼠 HSC 数目减少，为了研究短期应激对小鼠髓系来源细胞的影响与其对 HSC 数目的影响是否一致，我们通过流式细胞术分析对照组和短期应激组小鼠骨髓中 CD11b⁺Ly6C⁺ 细胞，结果显示，与对照组相比，经过短期束缚的小鼠 CD11b⁺Ly6C^{lo} 细胞的比例 ($P = 0.003$) 和绝对数 ($P = 0.037$) 以及 CD11b⁺Ly6C^{hi} 细胞的比例 ($P < 0.001$) 和绝对数 ($P = 0.005$) 均增加 (图 6)。

2.7 短期应激使小鼠外周血CD11b⁺Ly6C⁺细胞的绝对数增加

如前所述，短期应激使小鼠骨髓髓系来源细胞产出增多，为探讨骨髓中 CD11b⁺Ly6C⁺ 细胞的紊乱是否存在于外周血，我们检测了外周血中髓系细胞比例与绝对数的变化。流式细胞术结果显示，与对照组相比，经过短期束缚的小鼠外周血 CD11b⁺Ly6C^{lo} 细胞的比例 ($P = 0.003$) 和绝对数 ($P = 0.003$) 均增加，而 CD11b⁺Ly6C^{hi} 细胞的比例 ($P = 0.005$) 和绝对数 ($P = 0.013$) 均下降。因为 CD11b⁺Ly6C^{lo} 和 CD11b⁺Ly6C^{hi} 细胞的变化趋势不一致，我们又计算了两个亚群的比例和绝对数之和，发现 CD11b⁺Ly6C⁺ 细胞比例 ($P = 0.013$) 和绝对数 ($P = 0.009$) 均增加 (图 7)。

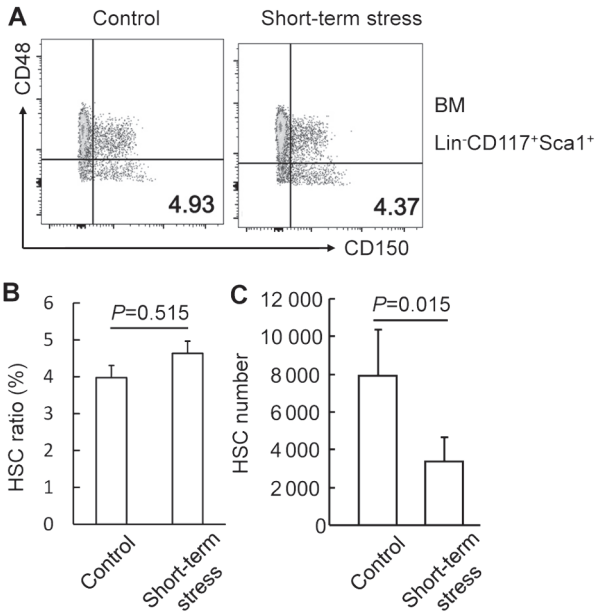


图 4. 短期应激对小鼠骨髓造血干细胞的比例和绝对数的影响
Fig. 4. Effects of short-term stress on the ratio and absolute number of hematopoietic stem cells (HSCs) in the bone marrow (BM) of C57BL/6 mice. BM mononuclear cells were subjected to flow cytometry for Lin (B220, Ter119, CD11b, Gr1, CD3, CD4, CD5, CD8), CD117, Sca1, CD150, and CD48 staining. A: Representative data. B: Ratio ($P = 0.515$). C: Absolute number ($P = 0.015$). Results are expressed as mean \pm SD, $n = 3$.

3 讨论

HSC 是存在于骨髓中的干细胞，它可以分化成为任何一种血细胞前体细胞，并维持自我更新能

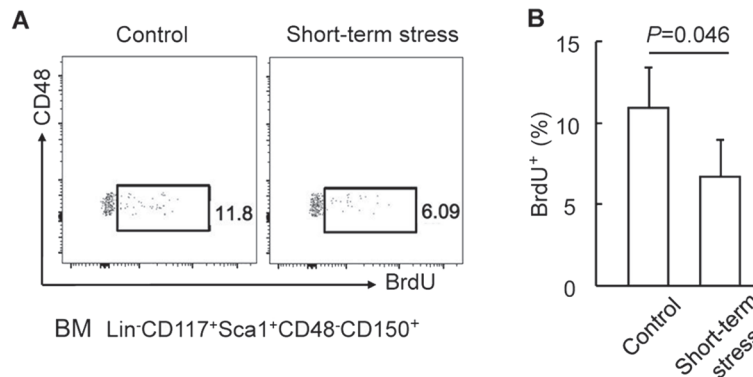


图 5. 短期应激对小鼠骨髓造血干细胞增殖的影响
Fig. 5. Effects of short-term stress on hematopoietic stem cell (HSC) proliferation in the bone marrow (BM) of C57BL/6 mice. BM mononuclear cells were subjected to flow cytometry for Lin (B220, Ter119, CD11b, Gr1, CD3, CD4, CD5, CD8), CD117, Sca1, CD48, CD150, and BrdU staining. A: Representative data. B: BrdU⁺ ratio. Results are expressed as mean \pm SD, $n = 4$.

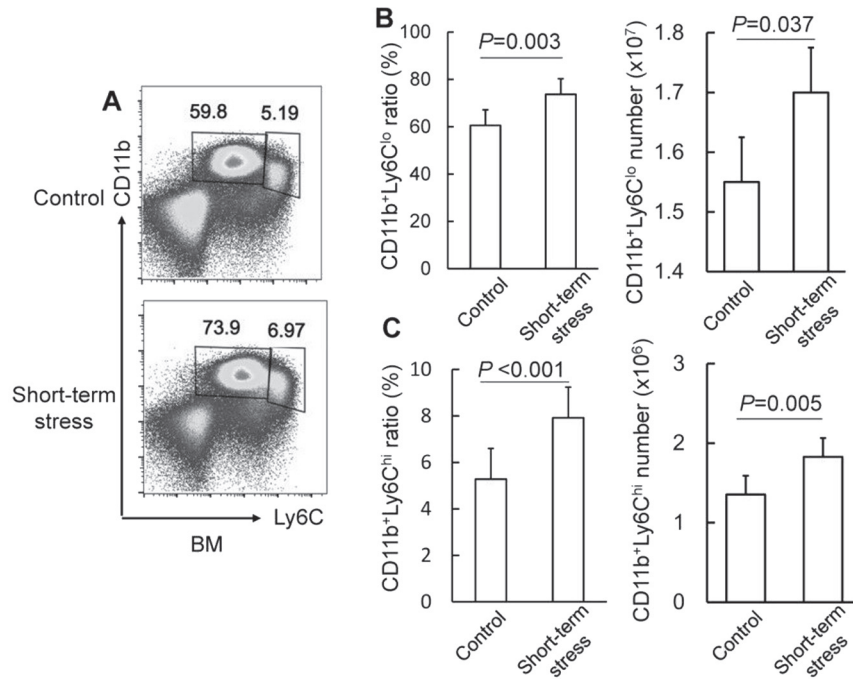


图 6. 短期应激对小鼠骨髓CD11b⁺Ly6C⁺细胞的比例和绝对数的影响

Fig. 6. Effects of short-term stress on the ratio and number of CD11b⁺Ly6C⁺ cells in the bone marrow (BM) of C57BL/6 mice. BM mononuclear cells were subjected to flow cytometry for Ly6C and CD11b staining. *A*: Representative data. *B*: Ratio ($P = 0.003$) and absolute number ($P = 0.037$) of CD11b⁺Ly6C^{lo} cells. *C*: Ratio ($P < 0.001$) and absolute number ($P = 0.005$) of CD11b⁺Ly6C^{hi} cells. Results are expressed as mean \pm SD, $n = 4$.

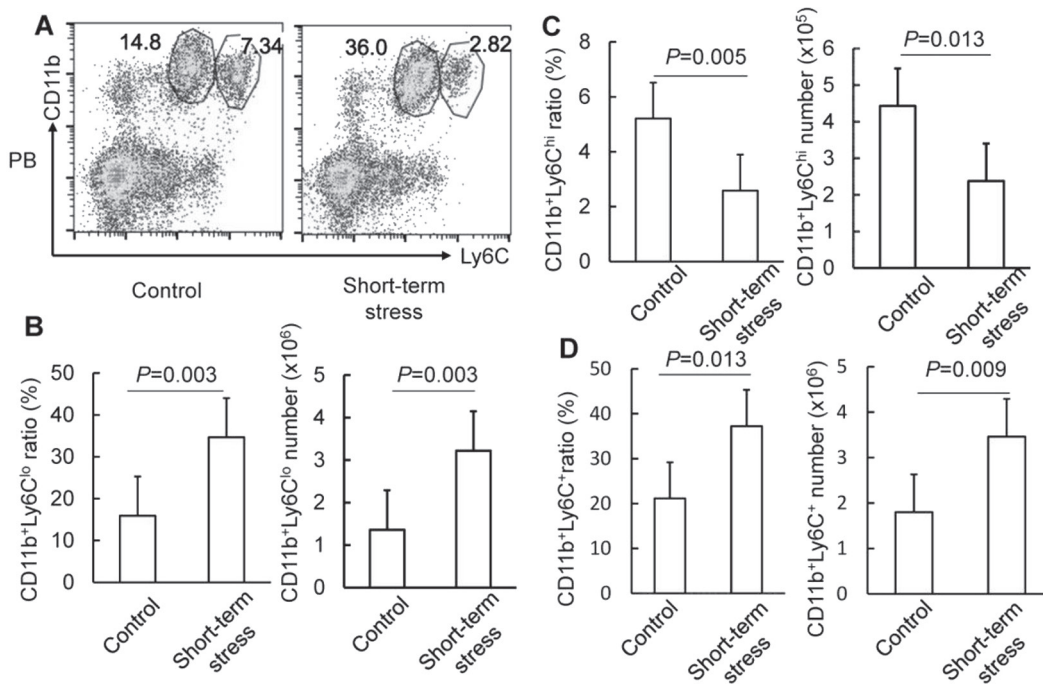


图 7. 短期应激对小鼠外周血CD11b⁺Ly6C⁺细胞比例和绝对数的影响

Fig. 7. Effects of short-term stress on the ratio and absolute number of CD11b⁺Ly6C⁺ cells in the peripheral blood of C57BL/6 mice. Peripheral blood cells were subjected to flow cytometry for Ly6C and CD11b staining. *A*: Representative data. *B*: Ratio ($P = 0.003$) and absolute number ($P = 0.003$) of CD11b⁺Ly6C^{lo} cells. *C*: Ratio ($P = 0.005$) and absolute number ($P = 0.013$) of CD11b⁺Ly6C^{hi} cells. *D*: Ratio ($P = 0.013$) and absolute number ($P = 0.009$) of CD11b⁺Ly6C⁺ cells. Results are expressed as mean \pm SD, $n = 8$.

力^[5]。骨髓是主要的造血场所, 它为 HSC 提供了一个健康且至关重要的环境, 以便其更新和分化^[7]。文献报道提示长期慢性心理应激导致小鼠 HSC 活化, 细胞比例和绝对数均增加^[6,7]。本文通过流式细胞术同样发现长期束缚应激导致骨髓中 HSC 比例和绝对数增加, 与文献报道^[6,7]相一致。有文献报道, 过量的儿茶酚胺通过 β_3 肾上腺素受体信号通路降低 CXCL12 水平从而导致长期应激后骨髓中 HSC 活化扩增^[9]。为了探讨相关机制, 我们通过流式细胞术研究了短期慢性束缚应激对小鼠骨髓中 HSC 的影响, 结果显示其与长期束缚结果相反。限制性束缚 5 天后, 骨髓中 HSC 的绝对数下降, 伴有 BrdU 掺入减少。因此短期应激后 HSC 增殖减少可能是骨髓中 HSC 数量减少的关键机制之一; 升高的应激激素也可能造成 HSC 凋亡甚至异常迁移, 这些因素可能协同造成了骨髓中 HSC 减少。有文献报道应激引起交感神经系统兴奋, 伴有体内儿茶酚胺释放水平升高^[16], 因此本研究结果提示儿茶酚胺不是影响 HSC 的唯一因素, 可能体内逐渐改变的微环境参与了复杂的动态调控过程^[17]。需要指出的是, 本研究中关于 HSC 数量变化的结果是基于流式细胞术, 由于用于流式细胞术分析 HSC 的分子表面标记可能会在应激状态下发生改变, 后续应该增加一种 HSC 功能检测的手段来进一步验证本研究的结果。

有学者认为, 由于 HSC 的增加, 使得慢性心理应激状态下中性粒细胞和单核细胞等髓系来源细胞产出增多^[9]。于是, 我们研究了束缚应激对骨髓中髓系 CD11b⁺Ly6C⁺ 细胞的影响。CD11b⁺Ly6C⁺ 细胞分为 CD11b⁺Ly6C^{lo} 和 CD11b⁺Ly6C^{hi} 两个亚群^[8,9]。本研究结果显示, 无论长期应激还是短期应激, 均导致骨髓中这两个亚群细胞绝对数增加。但这些细胞绝对数在短期束缚后就已经增加, 而此时 HSC 绝对数下降, 因此我们认为 HSC 绝对数增加可能不是 CD11b⁺Ly6C⁺ 细胞绝对数增加的主要原因。本研究结果还显示, 外周血中 CD11b⁺Ly6C^{lo} 亚群的变化趋势与骨髓相同, 而 CD11b⁺Ly6C^{hi} 亚群则与骨髓中的变化趋势有较大不同。因为 CD11b⁺Ly6C^{hi} 亚群相当于人类中的炎症性单核细胞, 推测其增加可能是慢性心理应激状态下机体呈现系统性低水平炎症的主要原因之一^[8,9], 因此其在各组织器官中的分布特征值得进一步研究。另外, 外周血中 CD11b⁺Ly6C^{lo} 亚群比例高于 CD11b⁺Ly6C^{hi} 亚群, 因

此外周血 CD11b⁺Ly6C⁺ 细胞总数变化趋势与 CD11b⁺Ly6C^{lo} 亚群相同。本研究结果显示, 无论长期应激还是短期应激, 均导致髓系细胞总数增加或者呈现增加趋势。在外周血白细胞中, 除了髓系细胞, 主要就是淋巴细胞, 因此本研究结果提示淋巴细胞比例在慢性心理应激状态下应该下降或者呈现下降趋势, 可以间接说明慢性心理应激负向作用于免疫系统。

参考文献

- 1 Chiriță AL, Gheorman V, Bondari D, Rogoveanu I. Current understanding of the neurobiology of major depressive disorder. *Rom J Morphol Embryol* 2015; 56: 651–658.
- 2 Campos AC, Fogaca MV, Aguiar DC, Guimarães FS. Animal models of anxiety disorders and stress. *Braz J Psychiatry* 2013; 35 Suppl 2: S101–S111.
- 3 Webster JI, Tonelli L, Sternberg EM. Neuroendocrine regulation of immunity. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 125–163.
- 4 Barua CC, Buragohain L, Rizavi H, Gogoi SB, Rahman F, Siva B, Mounika K, Babu KS, Pathak DC, Phukan A. Effect of seeds of *Entada phaseoloides* on chronic restrain stress in mice. *J Ayurveda Integr Med* 2018; DOI: 10.1016/j.jaim.2018.02.140.
- 5 Glaser R. Stress-associated immune dysregulation and its importance for human health: a personal history of psychoneuroimmunology. *Brain Behav Immun* 2005; 19(1): 3–11.
- 6 Jin JF, Wang XQ, Wang QY, Guo XR, Cao JX, Zhang XY, Zhu T, Zhang DL, Wang WD, Wang J, Shen BF, Gao X, Shi YC, Zhang JY. Chronic psychological stress induces the accumulation of myeloid-derived suppressor cells in mice. *PLoS One* 2013; 8(9): e74497.
- 7 Szade K, Gulati GS, Chan CKF, Kao KS, Miyanishi M, Marjon KD, Sinha R, George BM, Chen JY, Weissman IL. Where hematopoietic stem cells live: the bone marrow niche. *Antioxid Redox Signal* 2018; 29(2): 191–204.
- 8 Zhu EB, Hu LN, Wu HX, Piao LM, Zhao GX, Inoue A, Kim W, Yu CL, Xu WH, Bando YK, Li X, Lei YN, Hao CN, Takeshita K, Kim WS, Okumura K, Murohara T, Kuzuya M, Cheng XW. Dipeptidyl peptidase-4 regulates hematopoietic stem cell activation in response to chronic stress. *J Am Heart Assoc* 2017; 6(7): e006394.
- 9 Heidt T, Sager HB, Courties G, Dutta P, Iwamoto Y, Zaltsman A, von Zur Muhlen C, Bode C, Fricchione GL, Denninger J, Lin CP, Vinegoni C, Libby P, Swirski FK, Weissleder R, Nahrendorf M. Chronic variable stress activates hematopoietic stem cells. *Nat Med* 2014; 20(7): 754–758.
- 10 Lee S, Rhee DK. Effects of ginseng on stress-related depres-

- sion, anxiety, and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Ginseng Res* 2017; 41(4): 589–594.
- 11 Guo Y, Xie JP, Deng K, Li X, Yuan Y, Xuan Q, Xie J, He XM, Wang Q, Li JJ, Luo HR. Prophylactic effects of *Bifidobacterium adolescentis* on anxiety and depression-like phenotypes after chronic stress: a role of the gut microbiota-inflammation axis. *Front Behav Neurosci* 2019; 13: 126.
- 12 Wang S, Wang CH, Yu ZX, Wu CM, Peng DQ, Liu XM, Liu YY, Yang Y, Guo P, Wei JH. Agarwood essential oil ameliorates restraint stress-induced anxiety and depression by inhibiting HPA axis hyperactivity. *Int J Mol Sci* 2018; 19 (11): e3468.
- 13 Ota Y, Ago Y, Tanaka T, Hasebe S, Toratani Y, Onaka Y, Hashimoto H, Takuma K, Matsuda T. Anxiolytic-like effects of restraint during the dark cycle in adolescent mice. *Behav Brain Res* 2015; 284: 103–111.
- 14 Chen J, Ellison FM, Keyvanfar K, Omokaro SO, Desierto MJ, Eckhaus MA, Young NS. Enrichment of hematopoietic stem cells with SLAM and LSK markers for the detection of hematopoietic stem cell function in normal and Trp53 null mice. *Exp Hematol* 2008; 36(10): 1236–1243.
- 15 Seita J, Weissman IL. Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2010; 2(6): 640–653.
- 16 Zhao M (赵敏), Zhang JY. Chronic psychological stress and immunity. *Chin J Immunol (中国免疫学杂志)* 2017; 33(7): 961–966 (in Chinese with English abstract).
- 17 Perfilyeva YV, Abdolla N, Ostapchuk YO, Tleulieva R, Krasnoshtanov VC, Belyaev NN. Expansion of CD11b⁺ Ly6G^{high} and CD11b⁺CD49d⁺ myeloid cells with suppressive potential in mice with chronic inflammation and light-at-night-induced circadian disruption. *Inflamm Res* 2017; 66(8): 711–724.