

小鼠骨髓细胞及骨髓基质细胞混合输注对受致死剂量照射小鼠造血重建的影响

刘 静¹ 纪树荃¹ 秦凤华² 陈惠仁¹ 柳小兰² 耿 玉²

¹(空军总医院血液科 北京 100036)

²(北京放射医学研究所 北京 1000850)

摘要 为观察小鼠骨髓细胞 (BMC) 及骨髓基质细胞 (BMSC) 混合输注对受致死剂量照射小鼠造血重建的影响, 给予受致死剂量照射的 Balb/c 小鼠输注同基因 BMC 1×10^7 个及经体外扩增的同基因原代 BMSC 2×10^5 个, 并与单纯骨髓移植组进行了比较。结果表明, 移植后第 14 天外周血白细胞、血小板回升较快, 第 15 天、第 20 天粒-单系祖细胞 (CFU-GM)、红系祖细胞 (BFU-E、CFU-E)、造血干细胞 (CFU-S) 明显高于后者, 第 20 天已达正常。说明原代 BMSC 不仅可以移植, 而且能够加快造血重建, 提高移植效果。

关键词 骨髓移植, 骨髓基质细胞, 体外扩增, 造血重建

中图分类号 R457.7, Q813.1⁺1, Q462

受致死剂量照射的小鼠, 除其造血细胞受到严重损伤外, 其造血微环境也遭到严重破坏。骨髓移植 (BMT) 输入的骨髓细胞大部分为造血细胞, 仅含很少量基质细胞。文献 [1~3] 报道, 移植中输入骨髓细胞 (BMC) 的同时输入小鼠骨髓基质细胞 BMSC 系、异基因骨髓基质细胞或脾基质细胞, 对造血有支持作用, 而同基因骨髓原代基质细胞对受致死剂量照射小鼠造血重建作用的报道文献很少, 本文就此进行探讨。

1 材料和方法

1.1 试剂

促红细胞生成素 (EPO)、粒单细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、甲基纤维素以及琼脂购自 Sigma 公司, 胎牛血清 (FCS) 购自中国科学院血液研究所。

1.2 实验动物

Balb/c 纯系小鼠, 雄性, 10-12 周龄, 体重 $20 \pm 2g$, 购自军事医学科学院动物研究所。

1.3 BMSC 的制备

将 Balb/c 小鼠引颈处死, 无菌条件下取双侧股骨及胫骨, 用 Hank's 液冲出骨髓, 用 4 号针头制成单细胞悬液, 离心洗涤 2 次, 加适量 RPMI 1640 培养液制成悬液, 计数。用含 15%FCS 的 RPMI 1640 液作为培养液, 加青、链霉素各 $100u/mL$, 再加入已制备好的细胞悬液, 使细胞浓度为 $2 \times 10^6/mL$ 。将该体系每 10mL 放入一 100mL 容积的培养瓶中, 于 $37^\circ C$ 、

收稿日期: 初稿 1999-10-20, 修回 2000-01-21

CO₂ 孵箱中培养。每周半量换液, 3周完全融合。使用前用 0.25% 胰酶加 0.02% EDTA 消化全部贴壁细胞, 再用弯头吸管进行吹打, 离心洗涤 2 次后, 用 0.9% 生理盐水调整细胞浓度为 $1 \times 10^6 / \text{mL}$ 。待回输机体用。

1.4 BMC 悬液的制备

取正常同系小鼠股骨, 用 RPMI 1640 液冲出全部骨髓, 用 4 号针头制成单细胞悬液, 用 0.9% 生理盐水调整细胞浓度为 $5 \times 10^7 / \text{mL}$, 待回输用。

1.5 照射条件

⁶⁰Co γ 射线行全身照射, 总剂量 8Gy, 剂量率 138cGy/s, 动物中心距辐射源 4m。

1.6 骨髓移植

将 30 只 Balb/c 小鼠随机分为 3 组, 每组 10 只。(1) 正常对照组; (2) 单纯移植组 (BMT): 照射后 4h 内经尾静脉输注 1×10^7 个 BMC; (3) 混合移植组 (BMT+BMSCT): 照射后 4h 内经尾静脉输注 2×10^5 个 BMSC 和 1×10^7 个 BMC。移植后相对无菌饲养。

1.7 外周血象测定

于 BMT 后第 7 天、第 14 天、第 20 天经尾静脉取血, Coulter 血细胞计数仪计数。

1.8 造血祖细胞测定

分别于 BMT 后第 15 天及第 20 天用琼脂法测定粒-单系祖细胞 (CFU-GM), 用甲基纤维素法测定早期红系祖细胞 (BFU-E) 及晚期红系祖细胞 (CFU-E)^[4]。

1.9 造血干细胞 (CFU-S) 测定

分别于 BMT 后第 15 天及第 20 天杀死正常对照组、单纯移植组、混合移植组小鼠, 取骨髓制成细胞悬液待用。将同系正常小鼠经 ⁶⁰Co γ 射线照射 8Gy, 由其尾静脉输入 2×10^5 个 BMC, 9 天后杀鼠取脾, Bouin's 液固定 24h, 解剖显微镜下计数脾脏表面形成的脾结节数。

1.10 统计学方法

各计数资料用 *t* 检验。

2 结果

2.1 BMSC 对外周血象的影响

照射后 1 周, 单纯移植组及混合移植组的外周血白细胞、血小板均较正常对照组明显下降, 而该两组间无明显差异。照射后两周, 混合移植组外周血白细胞、血小板均较单纯移植组高, 并有显著差异。第 20 天, 两组基本恢复正常 (见表 1)。

Tab.1 Effect of BMSC on peripheral blood parameters ($\times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$)

Group	Day7 after BMT		Day14 after BMT		Day20 after BMT	
	WBC	BPC	WBC	BPC	WBC	BPC
Normal control	11.0 \pm 2.4	1050.1 \pm 215.9	13.5 \pm 4.7	1122.4 \pm 201.1	11.8 \pm 2.1	1022.64 \pm 74.6
BMT	2.8 \pm 1.8	166.4 \pm 49.5	6.0 \pm 2.9	817.8 \pm 214.5	10.6 \pm 4.8	1056.1 \pm 190.8
BMT+ BMSCT	2.3 \pm 0.5	189.8 \pm 42.1	14.4 \pm 9.6 ⁽¹⁾	1237.5 \pm 175.2 ⁽¹⁾	11.0 \pm 3.7	1098.7 \pm 85.1

⁽¹⁾*p* < 0.05, compared with BMT group

2.2 BMSC 对红系、粒系祖细胞的影响

BMT 后第 15 天, 混合移植组的 CFU-GM、BFU-E、CFU-E 明显高于单纯移植组, 低于正常对照组。BMT 后第 20 天, 混合移植组的 CFU-GM、BFU-E、CFU-E 明显高于单纯移植组, 也高于正常对照组(见表 2)。说明 BMSC 红系、粒系祖细胞有明显促进作用。

Tab.2 Effect of BMSC on CFU-GM, BFU-E, CFU-E ($\bar{x} \pm s$)

Group	Day15 after BMT			Day20 after BMT		
	CFU-GM	BFU-E	CFU-E	CFU-GM	BFU-E	CFU-E
Normal control	83.8±4.6	93.0±6.9	241.5±11.7	87.4±6.5	95.0±8.9	247.8±2.9
BMT	28±2.6	41.0±3.7	100.5±6.5	39.4±4.4	80.3±6.2	204.0±13.3
BMT+ BMSC	36.3±2.2	67.0±2.9 ⁽¹⁾	197.0±7.8 ⁽¹⁾	108.8±7.2 ⁽¹⁾	117.5±8.6 ⁽¹⁾	364.0±18.6 ⁽¹⁾

⁽¹⁾ $p < 0.01$, compared with BMT group

2.3 BMSC 对造血干细胞的影响

BMT 后第 15 天, 混合移植组的 CFU-S 明显高于单纯 BMT 组, 低于正常对照组。BMT 后第 20 天, 混合移植组的 CFU-S 明显高于单纯 BMT 组, 也高于正常对照组, 但与后者无显著差异(见表 3)。表明骨髓基质细胞对造血干细胞有明显促进作用, 第 20 天时, 混合移植组小鼠骨髓造血功能已完全恢复。

Tab.3 Effect of BMSC on CFU-S ($\bar{x} \pm s$)

Group	Day15 after BMT CFU-S/ 2×10^5 MNC	Day20 after BMT CFU-S/ 2×10^5 MNC
Normal control	40.7±5.5	39.5±4.4
BMT	29.5±4.9	32.3±3.8
BMT+ BMSC	43.3±7.5 ⁽¹⁾	45.8±8.3 ⁽¹⁾
Irradiated control	0	0

⁽¹⁾ $p < 0.05$, compared with BMT group

3 讨论

本实验将小鼠骨髓单个核细胞按 $2 \sim 3 \times 10^6$ /mL 浓度在含 15%FCS 的 RPMI1640 液中进行培养, 3d 后开始进入对数生长期, 18~21d 形成完全融合的贴壁细胞层。经 2~3 周培养, 造血细胞已凋亡或已由半量换液换出, 剩下均为贴壁细胞, 其主要成分为成纤维细胞, 少量巨噬细胞、脂肪细胞、内皮细胞。成纤维细胞呈梭形, 纵横交错或呈流线形排列。

机体接受致死剂量照射后, 存在于骨髓中的造血干细胞、祖细胞迅速凋亡, 基质微环境遭到严重破坏, 而 BMT 或外周干细胞移植 (PBSCT) 输入的造血细胞中基质细胞含量很少, 在基质功能不全的情况下, 影响输入的造血细胞归巢、植入、增殖与分化, 有的甚至可以导致移植失败。帮助其尽快度过骨髓空虚期, 是提高其存活率、移植成功率的关键。BMSC 是否可

以移植,已通过动物实验及临床 I 期实验得到了证实^[5,6]。并且经静脉输入的供者基质细胞大部分归巢并定居于受者骨髓,输注后 1d, 72% 供者基质细胞即已达到受者骨髓^[7], 这为造血干、祖细胞的植入创造良好的微环境。通过回输 MHC 匹配的骨髓基质细胞, 可以从 4 个方面促进造血恢复: (1) 直接改善微环境, 增加龕位, 促进干细胞的归巢与植入。(2) 造血基质细胞分泌多种细胞因子 G-CSF、IL-3、IL-6、SCF 等, 刺激造血干细胞、祖细胞增殖、分化。(3) 与造血细胞直接接触, 通过细胞粘附和 / 或细胞表面分子调节来支持造血。(4) 其分泌的细胞外基质通过促进造血细胞与调控分子紧密粘附而促进造血^[8]。Fukushima 等^[9] 在小鼠骨髓及基质细胞混合移植实验中显示, 基质细胞输注可增加受体鼠脾 CFU-S 量, 可见基质细胞存在于 CFU-S 内或其周围支持 CFU-S 生长。在极期, 骨髓完全腾空至输入的骨髓细胞在新的微环境中植入、分化、增殖、产生成熟的白细胞、血小板释放入外周血, 需要一定时间, 故本实验在移植后 1 周时骨髓基质细胞对血象作用不明显, 在两周时可见有明显促进作用, 20d 时血象已恢复正常。实验结果显示, 原代 BMSC 不仅是可移植的, 而且能够促进造血恢复, 对造血干细胞和粒、红祖细胞的增殖有重要促进作用, 可达到比单纯骨髓移植更为理想的造血重建效果。

由于 BMSC 极易从骨髓中获得, 又易在体外扩增, 故在放射损伤、BMT、PBSCT 及基质功能障碍所致的血液系统疾病中具有良好的应用前景。

参 考 文 献

- 1 Qin F H, Xie S S. Chin J Hematol (in Chinese), 1998, 19:583-586
- 2 Liu J, Liu G J, Ling L *et al.* J Rorman Bethune Uni Med Sci (in Chinese), 1988, 14:493-496
- 3 Yu H C, Ling L, Li Y *et al.* J Radiat Res Radiat Proc (in Chinese), 1994, 12:40-43
- 4 Liu X Z. The Experiment Manual of Techniques for the Culture of Hemopoietic Pogenitor Cells (in Chinese). Beijing: Beijing Press, 1993
- 5 Keating A. Hum. Gene Ther, 1998, 9:591-600
- 6 Lazarus H M, Haynesworth S E, Gerson S L *et al.* Bone Marrow Transplant, 1995, 16:557-564
- 7 Piersma A H, Ploemacher R E, Brockbank K G M. Br J Haematol, 1983, 54:285-290
- 8 Fukushima N, Hiroyuki O. Crit Rev in Oncol/Hematol 1995, 20:255-270
- 9 Fukushima N, Ueno K, Ohkawa H *et al.* Exp Hematol, 1994, 22:1210-1216

THE EFFECT OF MIXED INFUSION OF BONE MARROW CELLS
AND BONE MARROW STROMAL CELLS ON HEMATOPOIETIC
RECONSTITUTION IN LETHALLY IRRADIATED MICE

LIU Jing¹ JI Shuquan¹ QING Fenghua², CHEN Hui ren¹ LIU Xiaolan², GENG Yu²

¹(Department of hematology, The general hospital of air force Beijing 100036)

²(Beijing institute of radiation medicine Beijing 100850)

ABSTRACT To observe the effect of mixed infusion of bone marrow and bone marrow stromal cells on hematopoietic reconstitution in lethally irradiated mice, Balb/c mice irradiated lethally received 1×10^7 syngeneic bone marrow cells and 2×10^5 syngeneic bone marrow stromal cells via the intravenous route. As compared with the simple BMT group, the WBC and the BPC in peripheral blood in mixed infusion group recover more quickly on day 14 after BMT and BMSCT. The numbers of CFU-GM, BFU-E, CFU-E, CFU-S in mixed infusion group are higher than that of the simple BMT group on day 15 and day 20 after BMT and BMSCT. Conclusion: primary cultured bone marrow stromal cells not only is transplantable, but also can accelerate hematopoietic reconstitution.

KEYWORDS Bone marrow transplantation, Bone marrow stromal cells, In vitro proliferation, Hematopoietic reconstitution

CLC R457.7, Q813.1+1, Q462