

# 放射损伤对骨髓基质细胞支持小鼠粒-巨噬系祖细胞生长的影响

郭朝华<sup>1</sup> 邹仲敏<sup>1</sup> 张勇<sup>2</sup> 孔佩艳<sup>3</sup> 周燕虹<sup>1</sup>  
周进明<sup>1</sup> 冉新泽<sup>1</sup> 栗永萍<sup>1</sup> 罗成基<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(第三军医大学复合伤研究所, <sup>2</sup>西南医院, <sup>3</sup>新桥医院 重庆 400038)

**摘要** 为阐明放射损伤时骨髓造血基质细胞支持粒-巨噬系祖细胞造血能力的变化。采用小鼠骨髓基质细胞体外融合培养和粒-巨噬系祖细胞集落(CFU-GM)培养法,观察5Gy照射对基质细胞支持小鼠CFU-GM生长的影响。结果表明,经5Gy照射后,骨髓基质细胞支持正常粒-巨噬系祖细胞造血的能力明显下降,以伤后3-5d最为显著,伤后10d仍未恢复至正常;当骨髓基质细胞和粒-巨噬系祖细胞均受到致伤因素作用时,照射组的CFU-GM形成能力下降更为明显,至正常对照组的10%以下。说明放射损伤后骨髓基质细胞的功能受到了不同程度的损伤,因此,在治疗由此所引起造血功能障碍的同时,应加强促进基质细胞修复的措施,可能会取得更满意的疗效。

**关键词** 放射损伤, 骨髓基质细胞, 粒-巨噬系祖细胞

**中图分类号** R818, R392

造血功能障碍是放射损伤时最基本的病理变化。此时的造血功能障碍涉及造血干/祖细胞和造血基质细胞损伤。骨髓造血基质细胞是造血微环境的重要组成部分,它支持机体的造血功能并参与造血调控、与造血干/祖细胞的归巢定位、自我更新、增殖和分化具有非常密切的关系。文献[1]的研究结果表明,在放射损伤时骨髓基质细胞的DNA含量、细胞周期及某些粘附分子表达等均发生了明显的变化,但对其在支持和调控造血功能变化方面了解尚不多。本实验旨在通过研究放射损伤时骨髓基质细胞对粒-巨噬系祖细胞生长的影响,阐明放射损伤时骨髓基质细胞在支持粒-巨噬系造血方面的功能变化及其修复规律,为今后更好地治疗放射损伤、促进造血修复提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物分组及致伤模型

昆明种健康小白鼠300只,雄性,体重18-22g。实验分为2组:照射组(R)180只,<sup>60</sup>Co射线照射5Gy,距离1.4m,剂量率1.27Gy/min;正常对照组(N)120只。照射后1、3、5、7和10d,分别将小鼠脱臼处死,放入75%酒精中浸泡5min,在无菌条件下,剥离出双侧股骨,用5mL 1640液,通过7号针头冲出全部骨髓,打匀后换4号针头过滤,制成单细胞悬液,计数有核细胞数。

### 1.2 骨髓基质细胞培养

培养体系为RPMI1640培养液,内含100U/mL的青霉素和100μg/mL链霉素、10%马血

全军“九五”攻关项目基金(96L045)资助

第一作者:郭朝华,男,1957年出生,1991年6月毕业于第三军医大学医学检验大专班,实验师,实验血液学专业

收稿日期:初稿2000-11-10, 修回2001-02-21

清、10%小牛血清和  $10^{-6}$  mol/L 氢化可松液, 分别加入上述各组小鼠的骨髓有核细胞, 细胞终浓度为  $2 \times 10^6$  /mL。充分混匀后加入 35mm 培养皿中, 给每个伤情组做 20—30 个重复皿, 每皿 2mL, 然后置入 37°C, 5%CO<sub>2</sub> 培养箱内孵育, 每周半量换液, 共培养 4 周后弃去培养上清液。

本实验损伤组和对照组每个时间点均活杀 5 只小鼠, 以取骨髓做基质细胞培养, 所有实验重复 3 次。

### 1.3 骨髓粒-巨噬系祖细胞(CFU-GM)培养

培养体系为 RPMI1640 培养液, 内含 25% 的马血清。分别加入上述各组小鼠的骨髓有核细胞, 细胞终浓度为  $1 \times 10^5$  /mL。然后置 37°C 水浴 15min, 加入琼脂(终浓度为 0.3%), 充分混匀并分别置于弃去上清液的基质细胞层上。放入含 5%CO<sub>2</sub> 的培养箱内, 37°C 孵育 7d, 用倒置显微镜计数, 以多于 50 个细胞组成的细胞团为一个 CFU-GM 集落。正常组及照射组各时间点的实验结果均以 3 次实验数据的平均值进行统计分析。

为了排除骨髓基质细胞层本身产生 CFU-GM 的可能, 本实验在正常及照射组的基质细胞层上均设置了不加骨髓有核细胞的空白对照。

### 1.4 统计分析

采用第四军医大学统计教研室研制的 SPLM 软件进行方差分析。

## 2 结果

### 2.1 照射组骨髓基质细胞对正常 CFU-GM 生长的影响

文献[1、2]的研究已证实, 放射损伤时骨髓基质细胞的超微结构、DNA 含量及粘附分子表达等均发生了明显的变化, 本实验进一步表明损伤动物来源的基质细胞, 其支持 CFU-GM 生长能力也受损, 结果见表 1。

Tab.1 The changes of ability of bone stromal cells to support the growth of CFU-GM both from normal or irradiated mice ( $\bar{x} \pm s$ )

Group	CFU-GM (per $10^5$ bone marrow cells)				
	1d	3d	5d	7d	10d
Normal stromal cells + Normal CFU-GM	69.60±7.57	58.25±5.76	58.50±7.43	58.80±9.78	57.60±6.43
Injured stromal cells + Normal CFU-GM	29.40±1.67 <sup>(2)</sup>	20.80±2.17 <sup>(2)</sup>	20.00±2.35 <sup>(2)</sup>	25.20±4.03 <sup>(2)</sup>	33.80±6.30 <sup>(2)</sup>
Normal stromal cells + Injured CFU-GM	43.60±8.97 <sup>(2)</sup>	7.00±2.12 <sup>(2)</sup>	8.60±2.07 <sup>(2)</sup>	42.00±7.65 <sup>(2)</sup>	61.20±6.14
Injured stromal cells + Injured CFU-GM	21.60±3.05 <sup>(2)</sup>	2.80±0.84 <sup>(2)</sup>	5.80±1.79 <sup>(2)</sup>	21.80±7.19 <sup>(2)</sup>	46.40±6.80
NSC alone	0	0	0	0	0
RSC alone	0	0	0	0	0

<sup>(2)</sup>  $p < 0.01$ , <sup>(1)</sup>  $p < 0.05$ , compared with normal control

NSC: normal stromal cells. RSC: stromal cells from irradiated mice

实验结果表明,在所有时间点照射组基质细胞层上生长的正常 CFU-GM 集落数均明显低于正常基质细胞层上生长的集落数。至伤后第 10d 时仍明显低于正常对照组。

## 2.2 正常基质细胞贴壁层上放射损伤组 CFU-GM 的生长情况

在正常的骨髓基质细胞贴壁层上,损伤组和对照组 CFU-GM 的生长情况见表 1。表 1 结果表明,在正常的基质细胞层上,5Gy 照射组小鼠骨髓 CFU-GM 的生长能力有明显变化。在伤后第 1 天时,CFU-GM 数即开始降低,伤后 3-5d 时降低更为明显,至第 7 天时开始有所恢复,但仍然低于正常,至第 10 天时已恢复至正常水平。

## 2.3 骨髓基质细胞和接种的造血细胞均来自照射组时 CFU-GM 的培养结果

放射损伤后 1-5d,在损伤基质细胞层上同一时间点的辐射组 CFU-GM 生长均明显受损,其中尤以伤后 3-5d 更为显著,7d 之后恢复,但 10 日时其平均值仍低于正常组。

正常的基质细胞和损伤的基质细胞空白对照,在本实验条件下,无 CFU-GM 集落生成。

# 3 讨论

造血微环境中的基质细胞对造血的调节作用主要通过和造血细胞的直接接触、产生细胞因子和细胞外基质等方式来实现<sup>[3]</sup>,它们之间复杂的物质和信息交流的正常进行才使机体得以维持正常的造血过程,而发生各种损伤时,则有可能对这一过程产生不同程度的影响。

一般认为,造血基质细胞的辐射敏感性低于造血干细胞<sup>[4]</sup>。在小鼠中,引起造血微环境功能受损伤的辐射剂量约为 5Gy。我们研究了经 5Gy 照射后的小鼠骨髓基质细胞与粒-巨噬系祖细胞间相互作用的变化,重点探讨骨髓基质细胞在损伤后的功能状态及修复规律。

在体外培养的正常基质细胞贴壁层上,放射损伤后早期 CFU-GM 的数量均有不同程度的降低,最低值出现在伤后 3-5d,但恢复较快,至伤后 10d 已恢复正常。当基质细胞受到损伤时,对在其表面生长的正常或放射后的 CFU-GM 的影响均较明显,且其恢复缓慢,至伤后 10d 时 CFU-GM 数仍明显低于正常组。值得注意的是放射损伤的基质细胞其支持正常 CFU-GM 最低时占正常对照值的 34%-36%(如表 1 中所见,3d 时正常对照组集落数为  $58.25 \pm 5.76$ ,而放射组为  $20.80 \pm 2.17$ ,仅占正常对照值的 36%;5d 时正常组为  $58.50 \pm 7.43$ ,放射组为  $20.00 \pm 2.35$ ,仅占 34%),与支持后 CFU-GM 结果(3d 时仅为  $7.00 \pm 2.12$ ,占 12%,5d 时为  $8.60 \pm 2.07$ ,占 15%)相比较,说明在 5Gy 照射后骨髓基质细胞的损伤在程度上不及粒-巨噬系祖细胞明显,但其功能异常的持续时间较长。提示基质细胞一旦受到损伤,其功能障碍和(或)其增殖能力损伤的修复甚为困难,且由于其在造血中的重要地位,机体造血功能的恢复也必然受到严重的影响。因此,我们认为在放射损伤引起的严重造血障碍中,基质细胞的功能障碍可能在其中起非常重要的作用。已有将基质细胞与造血细胞联合移植,促进造血恢复的报道<sup>[5,6]</sup>,这说明基质细胞在造血重建中的重要作用已被人们所重视。

当造血基质细胞和造血祖细胞同时受到损伤时,在基质细胞层上 CFU-GM 的生成能力进一步降低,进一步表明两者均受到放射损伤作用的影响,因此,在对放射损伤进行救治过程中,应在促进造血干/祖细胞数量和功能恢复的同时,采取促进骨髓基质细胞修复的有效措施,以加速放射损伤后的造血功能恢复和重建。

## 参 考 文 献

- 1 陈幸华, 罗成基. 第三军医大学学报, 1997, **19**(2):97  
CHEN X H, LUO C J. Acta Acad Med Milit Tert, 1997, **19**(2):97
- 2 陈幸华, 罗成基, 郭朝华等. 解放军医学杂志, 1999, **24**(1):10-14  
CHEN X H, LUO C J, GUO C H *et al.* Med J Chin PLA, 1999, **24**(1):10-14
- 3 Geryugina E I, Muller-Sieburg C E. Crit Rev Immunol, 1993, **13**(2):115-150
- 4 Zuckerman K S, Prince C W, Rhodes R K *et al.* Exp Hematol, 1986, **14**(11):1056-1062
- 5 Almeida-Porada G, Flake A W, Glimp H A *et al.* Exp Hematol. 1999, **27**(10):1569-1575
- 6 Gurevitch O, Prigozhina T B, Pugatsch T *et al.* Transplantation. 1999, **68**(9):1362-1368

## EFFECT OF MOUSE BONE MARROW STROMAL CELLS ON THE GROWTH OF GRANULOCYTE-MACROPHAGE PROGENITOR CELLS FROM MICE WITH RADIATION INJURY

GUO Chao<sup>1</sup> ZOU Zhongmin<sup>1</sup> ZHANG Yong<sup>2</sup> KONG Peinyan<sup>3</sup> ZHOU Yanhong<sup>1</sup>  
ZHOU Jinming<sup>1</sup> RAN Xinze<sup>1</sup> SU Yongping<sup>1</sup> LUO Chengji<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>PLA Research Institute of Combined Injury, Third Military Medical University,  
<sup>2</sup>Xinqiao Hospital, <sup>3</sup>Xi'nan Hospital, Chongqing 400038)

**ABSTRACT** To investigate the effect of mouse marrow stromal cells on the growth of granulocyte-macrophage progenitor cells (CFU-GM) from mice with radiation injury. Semi-solid culture of CFU-GM on the confluent adherent stromal cell layers of marrow cells was adopted. The experimental data demonstrated that the numbers of normal marrow CFU-MGM formed on stromal cell layers from mice with radiation injury were significantly reduced as compared with those from normal mice within 10d, especially at 3th and 5th day after injury. The supporting function of bone marrow stromal cells on the growth of CFU-GM was impaired under the irradiation conditions of which must not be neglected in clinical treatment of radiation-induced hematopoiesis dysfunction.

**KEYWORDS** Radiation injury, Bone marrow stromal cell, Granulocyte-macrophage progenitor cell

**CLC** R818, R392