

骨髓基质细胞对放射损伤复合烧伤 小鼠粒单系祖细胞生长的影响

罗成基 郭朝华 周燕虹 施炎

(第三军医大学防原医学教研室, 重庆 630038)

摘要 研究骨髓基质细胞对放射损伤复合烧伤小鼠粒单系祖细胞的影响。结果表明:(1) 基质细胞培养上清液可支持少量粒单系祖细胞集落(CFU-GM)生长, 而骨髓贴壁细胞层对 CFU-GM 有明显刺激生长作用。(2) 加入外源性粒单系集落刺激因子(GM-CSF)时, 未见到基质细胞对粒系祖细胞生长的影响。(3) 烧伤、放射损伤、放射烧伤复合伤后 3~5 d, 均见到 CFU-GM 生长受抑制。损伤后仍能见到基质细胞对粒系细胞生长的刺激作用。粒细胞受抑制严重的单放组和复合伤组, 基质细胞的刺激作用较单烧伤组明显。以上结果说明, 在放烧复合伤造血损伤的修复与重建过程中, 骨髓基质细胞起着良好的刺激作用。

关键词 放烧复合伤, 骨髓基质细胞, 粒单系祖细胞

放射损伤复合烧伤是核爆炸和核事故的主要损伤之一, 造血功能障碍是放烧复合伤最基本的病理变化。骨髓基质细胞是造血微环境的重要组成, 它参与调制造血。造血基质细胞的辐射损伤是造血功能障碍的机理之一。本文研究骨髓基质细胞与外源性 GM-CSF 对粒单系祖细胞生长的影响, 以探讨放烧复合伤的造血功能障碍与修复规律。

1 材料和方法

1.1 动物及分组

昆明种健康雄性小鼠 100 只, 体重 20~24 g。随机分为 4 组, 每组 25 只:(1) 单放组(R): ^{60}Co γ 射线照射 5 Gy, 距离 4 m, 照射率 1.27 Gy/min。(2) 单烧伤组(B): 背部剪毛占体表面积 15%, 3% 凝固汽油烧 7 s, 致成 III° 烧伤。(3) 放烧复合伤组(C): 照射 5 Gy 后 0.5 h 内烧伤 (15% III°)。(4) 正常对照组(N)。

各组动物于伤后 1、3、5、7、10 d, 分 5 批活杀(每组每批 5 只小鼠)。制备骨髓细胞样品计数有核细胞数, 每只动物取 3 个复样, 测定后取平均值。

1.2 GM-CSF 制备

取小鼠背侧横纹肌 1 g, 经 RPMI 1640 培养液漂洗, 剪碎。加 1640 培养液 7 ml、健马血清 2 ml, 37℃ 培养 7 d 后, 收集上清液作为 GM-CSF 液。

1.3 骨髓贴壁基质细胞培养

培养体系为 RPMI 1640 液, 内含 100 u/ml 青、链霉素, 加 15% 健马血清、10% 小牛血清、 10^{-6} mol/L 氢化考的松液。植入 2×10^6 /ml 骨髓有核细胞。37℃、5% CO_2 培养箱内孵育, 每周半量换液。第 28 d 结束培养, 涂片镜检只有骨髓贴壁基质细胞生长, 分别保留含或不含上清液的

国家自然科学基金资助项目

收稿日期: 初稿 1994-11-28, 修改稿 1995-02-24

贴壁基质细胞层,与贴壁基质细胞上清液,备用。

1.4 骨髓粒单系祖细胞(CFU-GM)培养

培养体系为 RPMI 1640 培养液, 25% 健马血清、10% 小鼠 GM-CSF 液(部分实验不加)。加入 1 ml $1 \times 10^5/\text{ml}$ 的正常、烧伤、放射或复合伤小鼠骨髓细胞。37℃ 水浴 15 min。加入琼脂(终浓度 0.2%)。再置基质细胞层上(基质细胞层去上清液, 培养液洗 2 次, 再加 0.5 ml 培养液), 或(0.5 ml)基质细胞上清液中, 放 5% CO_2 培养箱内, 37℃ 孵育 6 d。低倍镜计数, 以 ≥ 50 个细胞组成的细胞团为集落数。

2 结 果

2.1 无 GM-CSF 时基质细胞对粒单系祖细胞生长的影响(见表 1)

Tab 1. Effect of adherent stromal cell (non-CSF) on the formation of CFU-GM colonies after combined radiation-burn injury in mice ($\bar{x} \pm s$)

Group	Post injury/d	Case	Number of CFU-GM/ 1×10^5 BMC		
			Sup	Str	Str + Sup
N		25	12.2 ± 3.3	59.1 ± 16.6	64.7 ± 14.8
	1	5	10.0 ± 2.3	58.2 ± 3.3	66.4 ± 12.9
	3	5	$6.7 \pm 5.1^{(1)a}$	22.3 ± 8.7^b	23.6 ± 13.7^b
B	5	5	$11.0 \pm 4.1^{(2)}$	25.3 ± 11.3	$27.6 \pm 3.5^{(1)b}$
	7	5	17.7 ± 4.1	72.0 ± 28.9	$85.1 \pm 21.1^{(2)}$
	10	5	18.0 ± 4.7	102.0 ± 16.9	89.8 ± 21.8
R	1	5	6.6 ± 3.2	33.4 ± 6.9	$43.3 \pm 12.8^{(2)}$
	3	5	0.6 ± 0.8^b	$7.4 \pm 3.8^{b(2)}$	11.2 ± 3.3^b
	5	5	1.2 ± 0.8^b	8.8 ± 2.2^b	11.8 ± 3.6^b
C	7	5	9.4 ± 3.5	44.6 ± 11.7	45.1 ± 13.6
	10	5	11.6 ± 3.5	64.6 ± 16.8	64.0 ± 18.7
	1	5	6.5 ± 3.71	61.0 ± 7.1	73.2 ± 5.0
	3	5	1.4 ± 1.4^b	10.9 ± 7.2^b	13.8 ± 6.1^b
	5	5	1.5 ± 0.5^b	12.6 ± 7.8^b	14.5 ± 5.2^b
	7	5	8.4 ± 2.2^a	42.3 ± 11.2	42.9 ± 8.9^b
	10	5	12.6 ± 3.8	55.8 ± 10.9	63.0 ± 9.8

Note N: normal; B: burn; R: radiation; C: combined radiation-burn
CSF: colony stimulating factor; Str: stromal cell

Sup: supernate; BMC: bone marrow cell

$^{(a)}P < 0.05$, $^{(b)}P < 0.01$ compared with normal

$^{(1)}P < 0.05$, $^{(2)}P < 0.01$ compared with combined radiation-burn

粒系祖细胞培养体系中, 不加 GM-CSF 无 CFU-GM 生长, 但如加入基质上清液, 无论是正常组或三损伤组, 均有少量 CFU-GM 生长。

在不同培养条件间进行比较, 如将骨髓细胞接种于单纯基质细胞, 或含基质上清的基质细胞上, 则粒单系祖细胞生长较在单纯基质上清液中明显为好($P < 0.01$)。各时相点均能见此差别。

在 3 种培养条件下, 伤后第一天, 各组粒单系祖细胞生长受影响不大。三损伤组伤后 3~5 天, 粒系祖细胞生长均受到显著影响, 复合伤组可持续到第 7 天。

2.2 有GM-CSF时基质细胞对粒单系祖细胞生长的影响(见表2)

Tab 2. Effect of adherent stromal cell (containing CSF) on the formation of CFU-GM colonies after combined radiation-burn injury in mice ($\bar{x} \pm s$)

Group	Post injury/d	Case	Number of CFU-GM/ 1×10^5 BMC		
			CSF	CSF + Str	CSF + Str + Sup
N		25	102.8 $\pm$ 11.6	107.6 $\pm$ 11.5	118.1 $\pm$ 11.9
	1	5	97.8 $\pm$ 12.8	98.6 $\pm$ 16.4	106.0 $\pm$ 17.4
	3	5	36.1 $\pm$ 12.9 ^b	35.0 $\pm$ 12.3 ^{b(1)}	35.8 $\pm$ 6.4 ^{b(2)}
B	5	5	46.6 $\pm$ 11.9 ^{b2}	49.8 $\pm$ 16.0 ^{b(2)}	58.4 $\pm$ 20.2 ^{b(2)}
	7	5	114.6 $\pm$ 8.4 ⁽²⁾	124.2 $\pm$ 5.0 ⁽²⁾	125.0 $\pm$ 3.2 ⁽²⁾
	10	5	139.0 $\pm$ 12.8 ⁽²⁾	142.2 $\pm$ 15.4 ⁽¹⁾	142.8 $\pm$ 21.9 ^{a(2)}
	1	5	61.6 $\pm$ 16.8	61.7 $\pm$ 15.2 ^{b(1)}	66.2 $\pm$ 8.5 ^b
	3	5	16.8 $\pm$ 12.4 ^b	17.1 $\pm$ 10.5 ^b	16.1 $\pm$ 3.4 ^b
R	5	5	17.2 $\pm$ 8.4 ^b	17.6 $\pm$ 4.5 ^b	18.8 $\pm$ 6.4 ^b
	7	5	67.0 $\pm$ 18.3 ^b	63.4 $\pm$ 21.4 ^b	65.1 $\pm$ 13.0 ^{b(1)}
	10	5	91.2 $\pm$ 23.4	94.0 $\pm$ 42.5	119.2 $\pm$ 4.3
	1	5	89.2 $\pm$ 17.1	90.1 $\pm$ 3.4	94.7 $\pm$ 22.0
	3	5	17.8 $\pm$ 3.9 ^b	18.4 $\pm$ 4.9 ^b	18.7 $\pm$ 3.7 ^b
C	5	5	19.5 $\pm$ 5.6 ^b	20.2 $\pm$ 7.2 ^b	23.6 $\pm$ 6.4 ^b
	7	5	57.4 $\pm$ 10.1 ^b	58.9 $\pm$ 18.5 ^b	51.9 $\pm$ 10.8 ^b
	10	5	77.8 $\pm$ 17.6	76.8 $\pm$ 24.5	86.5 $\pm$ 6.5

Note as table 1

在不同培养条件下进行比较, 正常组或各伤情组同一时相点均未见显著差异($P>0.05$)。

与正常组相比, 三损伤组伤后 3~5 d(单放组和复合伤组持续到第 7 天), 三种不同培养条件下, 均可见到 CFU-GM 生长明显受抑制, 以伤后第 3 天降低最明显。单烧组第 7 天显著回升。复合伤组与单放组粒细胞受抑制明显重于单烧组, 回升均较迟。

3 讨 论

造血诱导微环境(HIM)是确定造血细胞生存、增殖和特异分化方向的微细环境, 具有支撑和营养造血细胞的作用, 并对其增殖状态和分化方向进行诱导、调控。它由间质(纤维和基质液)及多种细胞所组成。其细胞成分(基质细胞: Stromal cells)具有很强的粘附能力, 在体外液体培养中形成的贴壁细胞层, 有类似体内造血微环境的作用, 能在体外支持造血干细胞的增殖与分化^[1]。在贴壁细胞层上培养骨髓细胞, 可维持造血干细胞生长达数月之久^[2]。

本实验粒系培养体系中无基质细胞贴壁层又不加外源性 CSF 时, 空白对照皿未见 CFU-GM 生长。加入基质细胞培养上清液, 可支持少量 CFU-GM 集落生长。将此种无 CSF 的粒系培养体系置于骨髓贴壁基质细胞层上, CFU-GM 生长明显增多, 显示出骨髓基质细胞对粒单系祖细胞生长的刺激作用。将 1×10^5 骨髓有核细胞加入外源性 GM-CSF, 进行培养, 生成 CFU-GM 可达 102.34 ± 11.58 个。而有外源性 CSF 存在时, 无论正常组或三损伤组, 均未显示骨髓基质细胞对粒系祖细胞生长的影响。可能是基质细胞对粒系祖细胞的作用较弱, 被外源性 CSF 作用掩盖, 而未能表现出来。以上结果似表明, 骨髓贴壁细胞层可能通过分泌 CSF 样物质, 或贴壁细胞与粒

单系祖细胞直接接触,而对粒单系造血祖细胞发挥其刺激作用。

在制备骨髓基质细胞贴壁层时,经多次换液,基本可除去悬浮液中造血实质细胞成分,因此,认为贴壁细胞层中产生 CSF 类物质或作用的细胞应是基质细胞。

Toksoz^[3]发现,长期培养的骨髓细胞,在更换培养液后早期,可从条件培养液中分离出刺激因子。Gordon^[4]认为,造血细胞的细胞外基质成分中含有诸如纤维结合素(fibronectin)、造血结合素(haemonectin)等蛋白成分,它们将造血实质细胞粘附在基质细胞上,基质细胞以此为中介,近距离调节造血。Isuboi^[5]提出,骨髓基质细胞条件培养基含有的自分泌因子(autocrine)可能是 IL-1 与旁分泌因子(paracrine)即 CSF-1 或 M-CSF(巨噬细胞集落刺激因子),分别刺激骨髓纤维母细胞与巨噬细胞等的增长。

Zipor^[6,7]将小鼠骨髓细胞孵育2周,形成贴壁层,发现它能抑制粒系集落形成。如在贴壁细胞与靶细胞间放一薄层琼脂,则贴壁层对粒系集落的抑制作用消失。在近期的研究工作中证实,骨髓基质细胞对粒系细胞的影响是在“刺激”与“抑制”双重作用的动态平衡中发挥其调控作用^[8]。Bentley^[9]曾提出,基质细胞贴壁层对 CFU-S(脾脏造血祖细胞集落)的影响,主要是细胞间的相互作用。同时,也存在体液因子的作用。

烧伤、放射损伤和放烧复合伤后,均可见到 CFU-GM 明显受抑制,而又以单放组、复合伤组受抑制较重,单烧伤组较轻。放烧复合伤后,粒系造血的变化主要与放射损伤一致,但又具有烧伤的某些特点。

在有外源性 CSF 的条件下,基质细胞对 CFU-GM 生长的刺激作用被掩盖,但无外源性 CSF 时,基质细胞贴壁层却显示出对 CFU-GM 生长的良好刺激作用。单纯烧伤后,造血功能障碍不是主要的病理改变。因此,基质细胞对粒系造血的调控作用表现不突出。而伤后粒细胞受抑制较严重的单放组和复合伤组,基质细胞对粒系细胞的刺激作用则较明显。因此,可以认为,骨髓基质细胞在放烧复合伤造血损伤后的修复和重建过程中,起着良好的刺激作用。

参 考 文 献

- 1 Bernard R G, Floyd D W, Linda W. Blood, 1981, 58: 557
- 2 Reimann J, Burger H. Exp. Hematol, 1979: 45
- 3 Toksoz D, Dexter T M, Lord B I et al. Blood, 1980, 55: 931
- 4 Gordon M Y, Br J. Haematol, 1988, 70: 1
- 5 Tsuboi I, Morimoto K, Sakuma A. J. Radiat. Res., 1991, 32: 395
- 6 Zipori D, Sasson T. Exp. Hematol, 1980, 8: 816
- 7 Zipori D, Sasson T, Friedman S. Experimental Haematology Today P, 1982, 19
- 8 罗成基,郭朝华,周燕虹.实验血液学杂志,1994,2(1): 63
- 9 Bentley S A. Exp. Hematol, 1981, 9: 308

EFFECTS OF BONE MARROW STROMAL CELL ON THE GROWTH OF GRANULOPOIETIC PROGENITORS AFTER COMBINED RADIATION-BURN INJURY IN MICE

Luo Chengji Guo Zhaohua Zhou Yanhong Shi Yan

(Departement of Radiation Medicine, Third Medical College, Chongqing 630038)

ABSTRACT The present study was aimed to investigate the effects of bone marrow stromal cell on the growth of granulopoietic progenitors in mice with combined radiation-burn injury. It was found that: (1) The inhibition of CFU-GM growth in the cultured stromal cell was observed, whether extra CSF existed or not, after the 3~5 th day of combined radiation burn injury. Radiation injury and combined injury resulted in marked depression of it, than the burn injury. (2) Stimulation of the cultured stromal cell in the adherent layer on the growth of granulopoietic progenitors could be achieved. This action was obvious when the extra GM-CSF was absent. (3) Stimulation of stromal cells on CFU-GM formation was observed after all 3 kinds of injuries. The serious suppression of myelopoiesis in radiation and combined injury showed more obvious stimulation of stromal cells. The results indicated that bone marrow stromal cells played a significant role in reconstruction and recovery of hematopoietic disturbance after combined radiation-burn injury.

KEYWORDS Combined radiation-burn injury, Bone marrow stromal cell, Granulopoietic progenitor, GM-CSF