论著

文章编号:1000-5404(2006)07-0626-04

神经氨酸酶预处理对大鼠骨髓细胞分布及造血集落形成的影响

李 芳,彭代智,周 新,刘 敬,董征学,严 泉,林 恒,付国金 (第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要: 目的 通过观察不同浓度的神经氨酸酶(neuraminidase, Neu)预处理供体骨髓细胞(donor bone marrow cells, dBMCs),经外周静脉注射后在受体内各主要组织器官的分布及对肝脏造血集落形成的影响,筛选出使dBMCs靶向性分布于肝脏的Neu最适浓度。**方法** 以雄性SD大鼠为供体,Wistar雌性大鼠为受体。在dBMCs分布研究中,常规从雄性SD大鼠的股、胫骨制备dBMCs并用Neu处理。按Neu处理dBMCs的浓度将26只受体Wistar雌性大鼠分为4组,尾静脉注射$^{99}Tc^{m}$标记的dBMCs,5 h后测定各组织器官的放射性活度。在造血集落形成研究中,受体Wistar雌性大鼠12只随机分为2组,尾静脉注射处理及未处理的dBMCs 15 d后,取受体各主要器官,行病理组织学检测,光镜下观察造血集落形成情况。**结果** 在同一受体内,肝脏的dBMCs百分含量明显高于其他所测器官;以1.0 U/ml浓度的Neu预处理时,受体肝脏内dBMCs百分含量高于对照组,差异显著($t=2.653$, $P=0.024$),而肾脏内dBMCs百分含量低于对照组,差异显著($t=3.067$, $P=0.012$),脾脏内dBMCs百分含量明显低于对照组,差异非常显著($t=3.265$, $P=0.009$)。尾静脉注射15 d后受体肝内可见造血集落形成,造血集落数量和形态上实验组与对照组无差别。**结论** 在浓度为1.0 U/ml时,神经氨酸酶预处理可增强骨髓细胞与肝脏的亲和性,使经外周静脉输注的骨髓细胞靶向性分布于受体肝脏内,但对肝脏内造血集落的形成无影响。

关键词: 神经氨酸酶;骨髓细胞;肝脏;造血集落形成

中图法分类号: Q55; R322.47; R329.2 **文献标识码**: A

Effects of neuraminidase preconditioning on distribution and hematopoietic foci formation of donor bone marrow cells injected intravenously in rats

LI Fang, PENG Dai-zhi, ZHOU Xin, LIU Jing, DONG Zheng-xue, YAN Quan, LIN Heng, FU Guo-jin (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To select an appropriate concentration of neuraminidase (Neu) that enhances the affinity of Neu-treated donor bone marrow cells (dBMCs) to the liver by measuring the distribution and hematopoietic foci formation of Neu-treated dBMCs injected intravenously in rats. **Methods** The experiment consisted of two parts. For selecting an appropriate concentration of Neu, twenty-six female Wistar rats were randomly divided into four groups according to the concentration of Neu. The dBMCs were prepared from male SD rats by routine method and treated with 0, 0.5, 1.0, 2.0 U/ml Neu at 37 ℃ for 30 min. The untreated and Neu-treated dBMCs were labeled by $^{99}Tc^{m}$ and injected through the tail vein of female Wistar rats in each group. After 5 h, the radioactivity of various organs collected from sacrificed rats was measured by a gamma counter, and calculated the percentage of total radioactivity of all the organs from the same rat. To observe the formation of hematopoietic foci, 12 female Wistar rats were randomly divided into two groups. The dBMCs were treated with 0, 1.0 U/ml Neu and injected through the tail vein of female Wistar rats in each group. After 15 d, the recipient livers were collected from sacrificed rats and prepared for HE staining. The hematopoietic foci formation in livers was checked under light microscope. **Results** The radioactivity percentage in liver was much higher than any other organs in the same rat of different groups. At 1.0 U/ml Neu, the radioactivity in livers was higher than that in untreated group ($t=2.653$, $P=0.024$), the radioactivity in kidneys and spleen decreased as

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(2005CB522605)

Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects, 2005CB522605)

作者简介:李 芳(1970-),男,山西省右玉县人,硕士,主治医师,主要从事烧伤免疫、皮肤修复重建等方面的研究。E-mail: lyf628@163.com

通讯作者:彭代智,电话:(023)68754174, E-mail: dzpeng@yahoo.com

收稿日期:2006-02-17;**修回日期**:2006-03-07

compared with that of control group ($t=3.067$, $P=0.012$; $t=3.265$, $P=0.009$). At 15th day after injection, there was no significant change of hematopoietic foci formation in livers between Neu-treated and untreated groups. **Conclusion** The precondition with 1.0 U/ml Neu significantly increased the migration of dBMCs to the liver, but the distribution pattern of dBMCs in various organs and the hematopoietic foci formation in livers did not be affected.

Key words: neuraminidase; bone marrow cells; liver; hematopoietic foci formation

研究显示,肝脏在口服耐受和门静脉耐受中发挥重要的作用[1,2]。最近有研究表明经外周静脉注射神经氨酸酶(neuraminidase, Neu)预处理的供体骨髓细胞(donor bone marrow cells, dBMCs)能够取代门静脉注射诱导门静脉耐受的形成[3],但不同浓度 Neu 预处理 dBMCs 是否影响其经外周静脉注射后在受体内的分布及造血集落形成还少见报道。本研究用4种不同浓度(0、0.5、1.0、2.0 U/ml)的 Neu 预处理 Sprague-Dawley(SD)雄性大鼠 dBMCs,经 Wistar 雌性大鼠尾静脉注射,观察 dBMCs 在受体内各主要组织器官的分布及对造血集落形成的影响,筛选使 dBMCs 靶向性分于受体肝脏的 Neu 最适浓度,以期提高门静脉耐受诱导的可操作性。

1　材料与方法

1.1　实验动物

供体为清洁级 SD 大鼠 38 只,雄性,体质量(223±34)g;受体为 Wistar 大鼠 38 只,雌性,体质量(223±26)g,购于国家啮齿实验动物中心上海分中心。

1.2　主要试剂和仪器

Neu 购于中国北京纽英伦生物技术有限公司。$^{99}Tc^m$ 购于中国成都中和高通公司。环孢素(cyclosporin A, CsA)购于瑞士巴塞尔诺华公司。放免测量仪 FT-608 购于中国国营二六一厂。显微镜购于日本奥林巴斯公司。

1.3　dBMCs 悬液制备

采用1%戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射(ip)麻醉 SD 大鼠,剃毛,消毒后无菌条件下取 SD 大鼠股、胫骨,用冷 PBS 液(pH 7.2,含肝素 10 U/ml)冲洗骨髓腔,收集冲洗液并用200目不锈钢网过滤,离心(1 500 r/min)5 min,弃上清液;加入红细胞裂解液 5 ml,混匀后静置 5 min,离心(1 500 r/min)5 min,弃上清后收集 dBMCs,用 PBS 液(pH 7.2)洗涤 3 次,用 PBS 液调整细胞浓度为 5×10^6/ml。

1.4　Neu 预处理对 dBMCs 在受体内各主要组织器官分布的研究

1.4.1　实验分组　　受体 Wistar 大鼠 26 只,按 Neu 的浓度分为:对照组(0 U/ml, $n=6$)、0.5 U 组(0.5 U/ml, $n=8$)、1.0 U 组(1.0 U/ml, $n=6$)和 2.0 U 组(2.0 U/ml, $n=6$)。

1.4.2　Neu 预处理　　每管取上述 dBMCs 悬液 1 ml,依次加入浓度为 20 U/ml 的 Neu 0、25、50、100 μl,使其终浓度分别为 0、0.5、1.0、2.0 U/ml,在 37 ℃恒温水浴箱中孵育 30 min;然后用 PBS 液(pH 7.2)洗涤 3 次,再用 PBS 液调整细胞浓度为 5×10^6/ml。

1.4.3　同位素标记　　取上述 Neu 预处理后的 dBMCs 悬液 1 ml(细胞浓度为 5×10^6/ml),加入新鲜配制的 $SnCl_2$ 溶液 50 μl,混匀后置 37 ℃孵育 5 min。取 $^{99}Tc^m$ 0.3 ml(内含约 18.5×10^7 Bq)加入上述细胞悬液内,混匀后置 37 ℃孵育 30 min,离心(1 500 r/min)5 min。去上清液,沉淀物用生理盐水反复洗 2 次,收集沉淀细胞,用 PBS 制成细胞悬液。标记后的 dBMCs 用台盼蓝(trypan blue)染色法测定其活力需达 98% 以上。200 目不锈钢网过滤,再用 PBS 液调整细胞浓度为 5×10^6/ml 后备用。

1.4.4　受体各主要组织器官放射性活度检测　　受体 Wistar 大鼠称重后1%戊巴比妥钠麻醉(40 mg/kg, ip),尾静脉注射新标记的 dBMCs 悬液 1 ml,含细胞 5×10^6/ml。注射 5 h 后再次麻醉大鼠,放血处死后,取受体心、肝、脾、肺、肾、胸腺、股骨,FT-608 型放免测量仪检测各组织器官的放射性活度。

1.4.5　计算方法　　标记率 = 细胞悬液总放射性活度/(细胞悬液总放射性活度 + 清洗液总放射性活度)×100%。各器官的放射性活度占全部所测器官总放射性活度的百分率 = 各器官的放射性活度/全部所测器官的总放射性活度×100%。

1.5　Neu 预处理对受体各主要器官内造血集落形成的影响

1.5.1　实验分组　　受体 Wistar 大鼠 12 只,分为:0 U/ml 组(对照组, $n=6$)、1.0 U 组(1.0 U/ml, $n=6$)。

1.5.2　Neu 预处理　　每管取上述 dBMCs 混悬液 1 ml,依次加入浓度为 20 U/ml 的 Neu 0、50 μl,使其终浓度分别为 0、1.0 U/ml,37 ℃恒温箱中孵育 30 min,然后用 PBS 液(pH 7.2)洗涤 3 次,再用 PBS 液调整细胞浓度为 5×10^6/ml。

1.5.3　病理组织学检测　　受体 Wistar 大鼠称重后1%戊巴比妥钠麻醉(40 mg/kg, ip),尾静脉注射 dBMCs 悬液 1 ml,含细胞 5×10^6/ml。15 d 后再次麻醉大鼠,放血处死后取受体的肝、脾、胸腺、肺、肾和心,4% 多聚甲醛固定,脱水,石蜡包埋,切片,苏木精-伊红(HE)染色,光镜下观察造血集落形成情况。

1.5.4　造血集落认定　　参照 Deimann 等[4]的方法,在 400 倍光镜下,至少 10 个以上红细胞、粒细胞、大单核细胞组成的细胞簇视为 1 个造血集落,1 个巨核细胞也可认为 1 个造血集落。均以 10 个高倍视野(×400)的造血集落数作为对比。

1.6　统计学方法

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 12.0 统计软件进行独立样本 t 检验。

2　结果

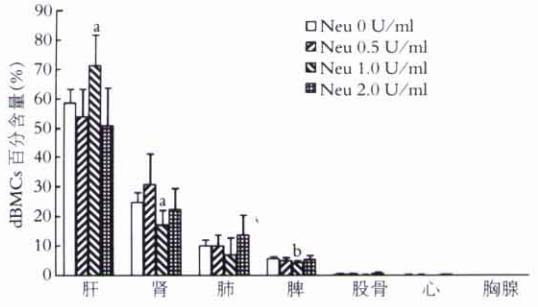
2.1　未处理 dBMCs 在大鼠体内的分布

未处理 dBMCs 经 $^{99}Tc^m$-$SnCl_2$ 法标记,标记率为(76.54%±3.09%)。结果显示,dBMCs 在同一受体内各组织器官的百

分含量依次为:肝(58.7% ±4.44%) > 肾(24.82 % ±3.44%) > 肺(10.18% ± 1.93%) > 脾(5.73% ± 0.73%) > 股骨(0.44% ±0.31%) > 心(0.16% ±0.05%) > 胸腺(0.05 % ± 0.01%)。其中,肝脏内 dBMCs 百分含量明显高于其他所测组织器官。

2.2 不同浓度 Neu 预处理对 dBMCs 在大鼠体内分布的影响

dBMCs 经 Neu 预处理,$^{99}Tc^{m}$-$SnCl_2$ 法标记,标记率为(76.31% ±3.20%)。结果显示,以 0.5、1.0、2.0 U/ml 浓度的 Neu 预处理时,dBMCs 在受体内各组织器官的分布与对照组(未处理 dBMCs)类似,依次为:肝 > 肾 > 肺 > 脾 > 股骨 > 心 > 胸腺,但 1.0 U/ml 组肝脏、肾脏、脾脏内的百分含量与对照组比较有显著差别。其中,1.0 U/ml 组受体肝脏内 dBMCs 百分含量明显高于对照组($t=2.653$, $P=0.024$),而肾脏内 dBMCs 百分含量低于对照组($t=3.067$, $P=0.012$),肺内 dBMCs 百分含量则由(10.18% ±1.93%)降低至(7.12% ±5.70%),但无统计学差异($t=1.250$, $P=0.240$),脾脏内 dBMCs 百分含量明显低于对照组($t=3.265$, $P=0.009$)。见图 1。

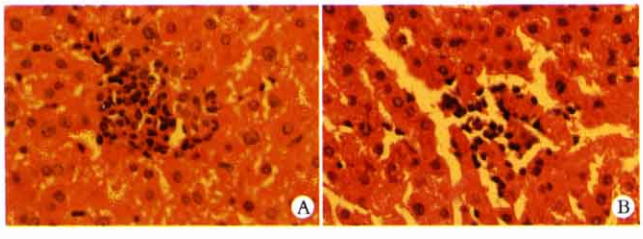


a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, 与对照组(Neu 0 U/ml)比较

图1 不同浓度 Neu 预处理的 dBMCs 在受体大鼠各组织器官内的分布

2.3 肝造血集落形成

尾静脉注射 15 d 后,取材、HE 染色,病理组织学观察结果显示,肝小叶清晰,中央静脉居中,肝板呈放射状排列,肝细胞为多边形,细胞质丰富呈圆形或近圆形,汇管区三联结构完整。每组受体肝脏内均有髓系细胞和/或红系细胞组成的造血集落形成,每个高倍镜下造血集落数量上实验组与对照组之间无差别,形态上也类似(图 2),而其他器官(脾、胸腺、肺、肾、心)内未见造血集落形成。



A: 对照组; B: Neu 1.0 U/ml 组

图2 受体肝脏内的造血集落形成 (HE ×400)

3 讨论

组织器官移植是目前治疗许多终末期疾病的重要方法之一,而诱导和维持特异性移植免疫耐受是控制移植后排斥反应、提高移植物存活率的关键。肝脏位于胃肠道和腔静脉系统之间,其单核吞噬细胞占全身总量的 90%,能吞噬处理大量来自胃肠道和门静脉的抗原,在口服耐受和门静脉耐受中发挥重要的作用[1,2]。临床资料也显示,肝脏移植后急性排斥反应的发生率及严重程度均明显低于肾移植。实验研究证明,门静脉注射异体淋巴细胞与肝移植诱导免疫耐受的机制相似[2]。目前用于诱导门静脉耐受的抗原主要有骨髓细胞[5,6],脾淋巴细胞[7]等,而这些抗原细胞经门静脉注射后在肝脏的聚集和归巢是引起门静脉耐受的关键[8]。门静脉穿刺操作复杂,增加腹外组织器官移植如皮肤移植的额外创伤,且有大出血等并发症发生的危险,因此有必要探索一种既能诱导门静脉耐受而又操作简便、安全、可靠的方法。

有研究表明,细胞表面碳水化合物的结构可影响淋巴细胞在机体内的分布,改变其表面糖蛋白分子的碳水链结构,可以改变其在血液循环中的半衰期[9]。Neu 是一种高度特异性的外切糖苷酶,能催化糖蛋白的特定糖苷键水解,释放唾液酸,形成无唾液酸糖蛋白。经 Neu 处理的淋巴细胞或骨髓细胞则成为含无唾液酸糖蛋白的细胞。由于肝细胞表面有无唾液酸糖蛋白的受体,因此,经 Neu 处理后的细胞对肝脏有极强的亲和性[10]。本研究结果显示,不同浓度的 Neu 预处理不影响 dBMCs 在各个器官的分布形式,仍以肝脏内分布最多,胸腺内分布最少;其中只有 1.0 U/ml 的 Neu 预处理可使受体肝脏内 dBMCs 的百分含量比对照组明显增多。因此,需选用特定浓度的 Neu 处理 dBMCs 才能达到肝脏靶向性增加 dBMCs 的目的。

曾有人观察了 dBMCs 经门静脉和 Neu-dBMCs 经外周静脉输注后 15 min 至 24 h 在小鼠肝脏和肺两个器官的动态分布;并认为 Neu-dBMCs 经外周静脉输注可增加肝脏的 dBMCs 分布[3],但不清楚其他器官的分布变化。本实验结果还显示,以 1.0 U/ml 浓度的 Neu 预处理时,受体肝脏内 dBMCs 的百分含量比对照组高 12.42%,而其余各组织器官内 dBMCs 百分含量均有不同程度降低,其中肾脏内降低 7.69%,肺内降低 3.06%,脾脏内降低 1.38%。可见,Neu 预处理 dBMCs 在肝脏内的显著增多主要是肾脏、肺和脾脏内的 dBMCs 减少所致。这表明以 1.0 U/ml 浓度的 Neu 预处理时,dBMCs 膜表面无唾液酸糖蛋白与含唾液酸糖

蛋白可能达到一个特定的比例,这时的 dBMCs 与肝脏的相应受体或配体结合增加,而与肾脏、肺和脾脏的结合减少。由此可以认为,肝脏内的无唾液酸糖蛋白受体或配体较其他组织器官内更多,因此以 1.0 U/ml 浓度的 Neu 预处理可使 dBMCs 靶向性分布于受体肝脏内,从而增强其对肝脏的亲和性。

骨髓细胞中含有丰富的造血干细胞、粒单祖细胞、红系祖细胞、淋巴祖细胞等。Neu 预处理 dBMCs 对受体各主要器官内造血集落形成影响的研究结果显示,在尾静脉注射 dBMCs 15 d 后,各组受体肝脏内均有造血集落形成,造血集落数量上实验组与对照组之间无差别,形态上也类似。肝脏的正常组织学形态未受影响,而在脾脏、胸腺、肺、肾脏、心脏内未见造血集落形成。这表明 Neu 预处理不影响造血干细胞及各系祖细胞增殖分化形成造血集落,但可增强 dBMCs 对肝脏的靶向性,使其在肝脏聚集增多,这对免疫耐受的诱导和维持具有重要作用。

本研究结果虽然显示 Neu 预处理的 dBMCs 对肝脏有极强的亲和性,而且可在受体肝脏内形成造血集落,但这些能否诱导组织器官移植的免疫耐受,这种耐受又能维持多久,我们将对此作进一步研究。

参考文献:

[1] ELVEVOLD K H, NEDREDAL G I, REVHAUG A, *et al.* Scavenger properties of cultivated pig liver endothelial cells[J]. Comp Hepatol, 2004, 3(1): 4.

[2] KENICK S, LOWRY R P, FORBES R D, *et al.* Prolonged cardiac allograft survival following portal venous inoculation of allogeneic cells: what is "hepatic Tolerance"? [J]. Transplant Proc, 1987, 19(1 Pt 1): 478 - 480.

[3] NAGAHAMA T, SUGIURA K, LEE S, *et al.* A new method for tolerance induction: busulfan administration followed by intravenous injection of neuraminidase-treated donor bone marrow[J]. Stem Cells, 2001, 19(5): 425 - 435.

[4] DEIMANN W, FAHIMI H D. Induction of focal hemopoiesis in adult rat liver by glucan, a macrophage activator. A cytochemical and ultrastructural study[J]. Lab Invest, 1980, 42(2): 217 - 224.

[5] WANG Y B, MATUSIMA T, KUSUMOTO K, *et al.* Transplantation of a whole ear allograft by immunological induction of donor-specific tolerance by bone marrow transplantation: an experimental study in rabbits [J]. Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg, 2005, 39(2): 73 - 76.

[6] YOSHIDA N, KAWAHARA T, FUTAGAWA S. Induction of donor-specific tolerance to allogeneic hepatocytes by allogeneic bone marrow transplantation[J]. Hepatol Res, 2003, 26(2): 148 - 153.

[7] KARA E, GOKHAN I, DAYANGAC M, *et al.* Effect of portal venous injection of donor spleen cells on skin allograft survival in rat[J]. Indian J Med Res, 2004, 119(3): 110 - 114.

[8] ZHANG Y, YASUMIZU R, SUGIURA K, *et al.* Fate of allogeneic or syngeneic cells in intravenous or portal vein injection: possible explanation for the mechanism of tolerance induction by portal vein injection [J]. Eur J Immunol, 1994, 24(7): 1558 - 1565.

[9] LEE S, SUGIURA K, NAGAHAMA T, *et al.* New method for thyroid transplantation across major histocompatibility complex barriers using allogeneic bone marrow transplantation[J]. Transplantation, 2001, 72(6): 1144 - 1149.

[10] DIAZ-PEROMINGO J A, GONZALEZ-QUINTELA A. Influence of gadolinium-induced kupffer cell blockade on portal venous tolerance in rat skin allograft transplantation[J]. Eur Surg Res, 2005, 37(1): 45 - 49.

(编辑　薛国文)

关于医学符号的使用

统计学符号不论用哪种字母,也不论大写或小写一律都用斜体。要注意区分拉丁字母和希腊字母。例如均数的符号是字母 x,卡方的符号是希腊字母 χ^2,自由度的符号是希腊文"υ",不是拉丁文"V"。样本的相关系数是英文"r",不能误为希腊文"γ"。

化学元素及核素在医学写作时一般多采用符号,都是拉丁字母正体大写。离子态是在右上角用数字加"-"或"+"表示。例如 Na^+、Ca^{2+}、P^{3-} 等等,不采用 Ca^{++}、P^{---}、Al^{+3}、O^{-2} 表示。核素的核子素(质量数)应写在元素符号的左上角,例如:^{131}I、^{32}P。表示激发状态的 m 写在右上角,例如:$^{99}Tc^{m}$、$^{133}In^{m}$。在科技论文和专著中不应写核素的中文名称,即不能写成^{131}碘、铟^{133m}、P^{32}、Tc^{99m}。

近几年分子生物学发展很快,并已渗透到许多学科,大多数分子生物学名词术语的符号已有统一的确定形式,要对符号的来源及其内涵有深刻的了解,使用时不致发生错误,例如:RNA 有 rRNA(ribosomal RNA)、tRNA(transfer RNA)、mRNA(messenger RNA)3 类。r、t、m 是表示类型的符号应小写,RNA 应大写。

本刊编辑部