文章编号:1000-5404(2006)20-2017-03

论著

烧伤后骨髓巨核细胞被噬现象机制的初步探讨

董岸莺,艾国平,粟永萍,韩 京,冉新泽,程天民 (第三军医大学军事预防医学院防原医学教研室,全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 初步探讨烧伤后骨髓巨核细胞被噬现象的机制。**方法** 采用光镜、电镜观察 30% Ⅲ度烧伤后大鼠骨髓巨核细胞的形态变化,分别分离正常和 30% Ⅲ度烧伤大鼠骨髓巨核细胞、中性粒细胞,采用 Transwell 双室培养法观察骨髓巨核细胞与中性粒细胞的游走关系。**结果** 30% Ⅲ度烧伤后大鼠骨髓巨核细胞部分细胞的细胞质呈局灶样坏死,部分中性粒细胞进入到巨核细胞的细胞质进行噬食,即巨核细胞被噬现象。扫描电镜显示,烧伤后巨核细胞形态不规则,表面呈现出珊瑚样的窟窿洞,而正常组的巨核细胞呈圆形,表面光滑。分离正常和烧伤后的中性粒细胞、巨核细胞分别进行双室交叉培养,发现烧伤组大鼠骨髓巨核细胞对中性粒细胞有明显的趋化作用,而正常骨髓巨核细胞对中性粒细胞的趋化作用不明显。**结论** 30% Ⅲ度烧伤后骨髓巨核细胞发生不同程度的损伤,且对中性粒细胞有很强的趋化作用,从而趋化后者进入损伤的巨核细胞,发生被噬现象。

关键词:烧伤;巨核细胞;中性粒细胞;被噬现象
中图法分类号:R331.22;R392.3;R644.02 **文献标识码**:A

Primary investigation on mechanism of megakaryocytophagia in rats after burns

DONG An-ying, AI Guo-ping, SU Yong-ping, HAN Jing, RAN Xin-Ze, CHENG Tian-min (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the morphological alterations of bone marrow megakaryocytes after burns and to analyze the mechanism of megakaryocytophagia. **Methods** The morphological alteration of bone marrow megakaryocytes in rats after burns (30% TBSA, full thickness burn) was observed with light-microscope and electron-microscope. Megakaryocytes and neutrophils isolated from rat bone marrow (normal and burned) were co-cultivated in Transwell co-culture system to observe their transmigration relationship. **Results** After burns, focal necrosis took place in the cytoplasm of megakaryocytes, and megakaryocytophagia occurred when neutrophils entered into megakaryocytes and then englobed them. The results of scanning electron microscope showed the surface of megakaryocytes after burns was coral hole-like while that of normal megakaryocytes was spherical and slick. Chemotactic tests demonstrated that megakaryocytes from burned rats had strong chemotactic effect on neutrophils while normal megakaryocytes had no such effect. **Conclusion** Megakaryocytes are injured after burns and exert strong chemotactic effect to neutrophils, which induces neutrophils to enter the injured mgakaryocytes and thus megakaryocytophagia take place.

Key words: burns; megakaryocyte; neutrophils; megakaryocytophagia

我室早期在研究放射损伤、严重烧伤、烧冲复合伤造血损伤时曾观察到大鼠、犬的骨髓巨核细胞被进入细胞质的中性粒细胞噬食的现象,并命名为“巨核细胞被噬现象”(megakaryocytophagia)[1],并认为巨核细胞被噬是导致损伤后血小板减少的重要原因,是引发机体出血的重要因素。在同一损伤条件下,同为骨髓造血细胞,哪种细胞为被噬的主导因素,如何进行噬食以及噬食的机制是什么,目前尚不清楚。我们在前期研究的基础上[2],以烧伤动物为模型,重点观察 30% Ⅲ度烧伤后大鼠骨髓的形态学变化和巨核细胞被噬现象,以双室培养法观察中性粒细胞向巨核细胞的趋化游走现象。

基金项目:国家自然科学基金资助重点项目(30230360)
Supported by the National Science Foundation of China (30230360)
作者简介:董岸莺(1981-),女,陕西省礼泉县人,硕士研究生,主要从事造血损伤与修复方面的研究。电话:(023)68771724,E-mail:007jojojo@sohu.com
通讯作者:艾国平,电话:(023)68752279, E-mail:aigping@yahoo.com
收稿日期:2006-03-07;**修回日期**:2006-05-30

1 材料与方法

1.1 动物模型的制作

Wistar 大鼠背部剪毛，乙醚麻醉，5 kW 溴钨灯光辐射致大鼠背部 30% 体表面积Ⅲ度烧伤，病理切片证实。

1.2 细胞分离与培养

1.2.1 巨核细胞的分离、培养、鉴定 采用文献[2]略加改进，取大鼠股骨，无菌条件下用 4 号针头反复冲洗骨髓腔，400 目细胞筛过滤骨髓腔冲洗液。用离心密度为 1.050 Ficoll (TBD)分离巨核细胞，用 IMDM + 10% 胎牛血清，37 ℃、5% CO_2 孵箱培养。采用特异性乙酰胆碱酯酶染色鉴定。

1.2.2 中性粒细胞的分离、培养、鉴定 取大鼠股动脉血，肝素抗凝。用离心密度为 1.091 Ficoll(TBD)分离中性粒细胞，用 IMDM + 10% 胎牛血清，37 ℃ 5% CO_2 孵箱培养。采用 HE 染色鉴定，分叶核为其标志。

1.3 指标检测

1.3.1 HE 染色观察 分别取正常和烧伤后大鼠股骨进行 HE 染色，观察烧伤骨髓形态学变化和巨核细胞被噬现象。

1.3.2 扫描电镜和透射电镜观察 分离正常和烧伤后大鼠股骨的巨核细胞，2.5% 戊二醛固定后送扫描和透射电镜观察。

1.3.3 Transwell 双室培养 Transwell 双室培养板，孔径为 5 μm。分别将正常和烧伤 24 h 大鼠的骨髓巨核细胞和外周血中性粒细胞进行交叉培养，上室为中性粒细胞(密度为 1.25×10^7 个/ml)，下室为巨核细胞(密度为 1.0×10^5 个/ml)。37 ℃、5% CO_2 孵育 6 h 后，取出 Transwell 小室，2.5% 戊二醛固定 20 min，HE 染色，穿过微孔膜的中性粒细胞的细胞核呈紫红色。计数穿过微孔膜到达膜底面的细胞数，每例观察 10 个视野，结果以细胞数/视野表示。分组如下：正常中性粒细胞 + 正常巨核细胞共培养组，烧伤中性粒细胞 + 烧伤巨核细胞共培养组，正常中性粒细胞 + 烧伤巨核细胞共培养组，烧伤中性粒细胞 + 正常巨核细胞共培养组，上室中性粒细胞下室仅有 IMDM 培养基为阴性对照组。

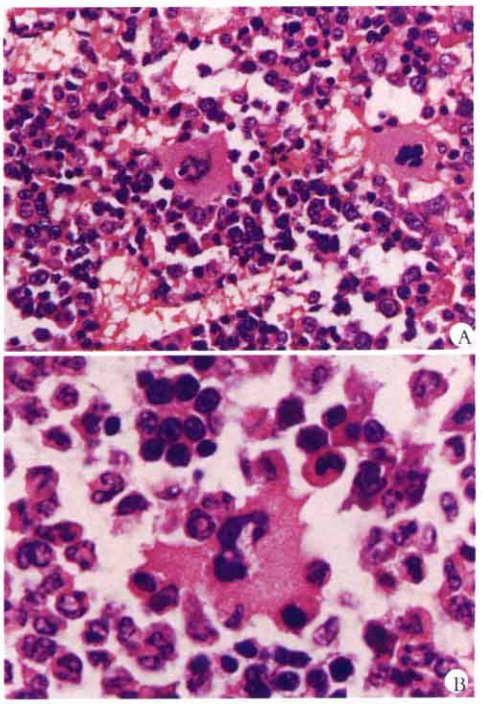
1.4 统计学分析

实验数据采用 SPSS 10.0 软件行单因素方差分析(ANOVA)。

2 结果

2.1 烧伤大鼠骨髓形态学变化和被噬现象观察

大鼠 30% Ⅲ度烧伤后 24 h，骨髓腔充血明显，巨核细胞退变，部分巨核细胞的细胞质溶解(图 1A)，退变的巨核细胞周围有大量的中性粒细胞进入到巨核细胞的细胞质，巨核细胞呈“虫蚀”样改变(图 1B)。

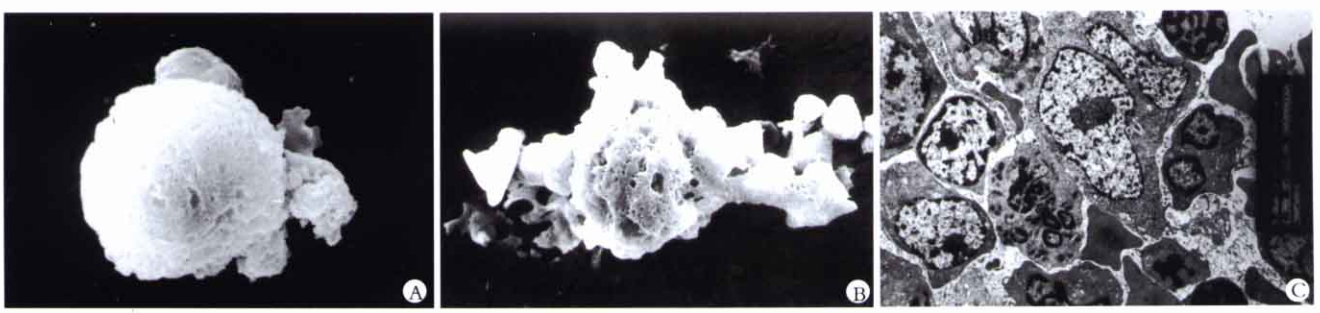


A：巨核细胞 (HE ×100)；B：中性粒细胞 (HE ×400)

图 1 烧伤大鼠骨髓形态学变化

2.2 骨髓巨核细胞电镜观察

正常大鼠骨髓巨核细胞扫描电镜显示，巨核细胞呈圆形，表面光滑(图 2A)，烧伤后巨核细胞呈不规则形状，表面不平整，呈现出珊瑚样的窟窿洞(图 2B)。透射电镜观察显示，烧伤后巨核细胞核皱缩，染色质浓缩边集，细胞质细胞器减少，有局灶样坏死，并可见中性粒细胞进入到巨核细胞的细胞质中，有“伪足”伸出(图 2C)。

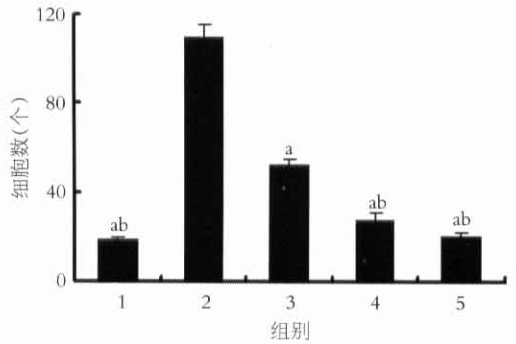


A：正常大鼠骨髓巨核细胞 (SEM ×2 000)；B：烧伤后大鼠骨髓巨核细胞 (SEM ×2 000)；C：烧伤后大鼠骨髓巨核细胞 (TEM ×2 900)

图 2 骨髓巨核细胞电镜观察

2.3　Transwell 双室趋化实验

用 Transwell 双室培养法观察可见，上室为中性粒细胞，下室仅有 IMDM 培养基的阴性对照组未见有中性粒细胞穿过，而烧伤中性粒细胞 + 烧伤巨核细胞共培养组则有大量中性粒细胞穿过，与正常中性粒细胞 + 正常巨核细胞共培养组、正常中性粒细胞 + 烧伤巨核细胞共培养组、烧伤中性粒细胞 + 正常巨核细胞共培养组，以及阴性对照组相比，均有显著性差异（$P < 0.01$）。同时可见，正常中性粒细胞 + 烧伤巨核细胞共培养组也有大量中性粒细胞穿过，与正常中性粒细胞 + 正常巨核细胞共培养组、烧伤中性粒细胞 + 正常巨核细胞共培养组，以及阴性对照组相比，也有显著性差异（$P < 0.01$）（图 3）。



a：$P < 0.01$，与 2 组比较；b：$P < 0.01$，与 3 组比较
1：正常中性粒细胞 + 正常巨核细胞共培养组；2：烧伤中性粒细胞 + 烧伤巨核细胞共培养组；3：正常中性粒细胞 + 烧伤巨核细胞共培养组；4：烧伤中性粒细胞 + 正常巨核细胞共培养组；5：阴性对照组

图 3　各组 Transwell 穿膜细胞数变化

3　讨论

我们前期的研究显示，在犬放射病恢复后期，在烧伤、冲击伤及其烧冲复合伤动物，以及烧伤患者尸检中骨髓巨核细胞可发生退行性变[4]，中性粒细胞包绕巨核细胞并进入其细胞质，将巨核细胞噬食，命名为“骨髓巨核细胞被噬现象”（megakaryocytophagia）。骨髓巨核细胞被噬是血小板减少、机体严重出血的重要因素[5]，但巨核细胞被噬现象的机制是什么？是中性粒细胞的主动出击，还是巨核细胞受损后发出某种信号吸引中性粒细胞前往？何种细胞占主导地位？对此一直未进行深入探讨。

本实验采用 30% Ⅲ度烧伤动物模型，光镜下可见烧伤大鼠骨髓充血明显，骨髓巨核细胞局部有退变、灶性坏死，在退变的细胞周围有大量的中性粒细胞包绕，亦可见中性粒细胞进入细胞质噬食，巨核细胞呈“虫蚀”样改变。扫描电镜显示正常的骨髓巨核细胞表面光滑，呈圆形，而烧伤后骨髓巨核细胞体积增大，形状不规则，表面凹凸不平，并可见“珊瑚样”窟窿洞，推测这些窟窿洞更有利于中性粒细胞进入巨核细胞质中。同时，利用改良的趋化实验，观察了巨核细胞与中性粒细胞的趋化关系。Transwell 是改良微孔小室中的实验装置，将培养空间分为上下两部分，中间的滤膜孔径为 5 μm，是体外研究细胞间相互作用，细胞迁移、趋化的理想实验装置。我们将能顺利穿过孔径的中性粒细胞置于上室，巨核细胞置于下室，各实验组放置的中性粒细胞和巨核细胞密度均分别相等，通过染色计数穿过微孔滤膜的中性粒细胞，观察各组巨核细胞与中性粒细胞相互作用的关系。结果表明，烧伤巨核细胞对烧伤中性粒细胞有明显的趋化作用，其游走穿过滤膜微孔的细胞数明显多于其他 3 组；而正常巨核细胞对正常中性粒细胞无明显的趋化现象，很少见中性粒细胞穿过滤膜微孔。尤其值得注意的是，烧伤巨核细胞对正常中性粒细胞也有趋化作用，表明巨核细胞在烧伤后骨髓巨核细胞被噬现象中占主导地位。烧伤后巨核细胞结构和功能的改变，趋化中性粒细胞向其游走、接触、穿入、噬食，最终清除病变细胞，相应使血小板生成不足，功能降低。此研究说明在同一损伤条件下，巨核细胞较中性粒细胞更易受到伤害，其被噬是损伤后的一种转归机制，也说明中性粒细胞具有清除机体自身退变细胞的功能[6,7]。巨核细胞的细胞质颗粒蛋白成分 NAP2、PF4 不但反馈抑制巨核细胞祖细胞的核多倍体化、成熟巨核细胞生成前血小板，还是趋化因子超家族成员[8,9]，与中性粒细胞趋化游走有直接或间接的联系。对烧伤后巨核细胞 NAP2、PF4 的表达情况，尚待进一步研究。

参考文献：

[1] CHENG T M, LIN Y, GU D Q, *et al*. Ultrastructural changes of bone marrow megakaryocytes in several types of injury[J]. Burns Incl Therm Inj, 1984, 10(4): 282 - 289.
[2] 冉新泽，粟永萍，郑怀恩，等. 放烧复合伤大鼠血清对小鼠骨髓造血祖细胞的影响[J]. 中国实验血液学杂志，2005，13(1)：121 - 125.
[3] 李启明，艾国平，刘小红，等. L203 对大鼠巨核细胞培养的影响[J]. 重庆医学，2005，34(5)：670 - 673.
[4] 郑怀恩，程天民，林　远. 烧冲复合伤时几种骨髓细胞的超微结构变化[J]. 第三军医大学学报，1989，11(5)：335 - 339.
[5] 郑怀恩，程天民. 犬烧冲复合伤时血小板的变化[J]. 第三军医大学学报，1990，12(3)：216 - 221.
[6] SHINTANI T, KLIONSKY D J. Autophagy in health and disease: a double-edged sword[J]. Science, 2004, 306(5698): 990 - 995.
[7] SAITO K, HIROKAWA M, FUKAYA H, *et al*. Dendritic cells co-developing from human CD34 + cells following incubation with thrombopoietin and tumor necrosis factor-alpha phagocytose self-megakaryocytic progenitors and induce autologous T-cell proliferation[J]. Blood, 2004, 104(11): 4132.
[8] ODA M, KURASAWA Y, TODOKORO K, *et al*. Thrombopoietin-induced CXC chemokines, NAP-2 and PF4, suppress polyploidization and proplatelet formation during megakaryocyte maturation[J]. Genes Cells, 2003, 8(1): 9 - 15.
[9] PANG L, WEISS M J, PONCZ M. Megakaryocyte biology and related disorders[J]. J Clin Invest, 2005, 115(12): 3332 - 3338.

（编辑　陈聪连）