维普资讯 http://www.cqvip.com

论著 文章编号:0253-3626(2007)06-0626-03

骨髓干细胞动员在深静脉血栓溶解中的作用

陈以宽,龚建平,罗文军,孙建民

(重庆医科大学附属第二医院普外科,重庆 400010)

【摘 要】目的:探讨骨髓干细胞动员在深静脉血栓溶解中的作用。方法:SD 成年大鼠随机分为正常组、假手术组、手术组、动员组(使用 rhG-CSF 皮下注射)。分析不同时点外周血单个核细胞计数、病理组织形态、血栓机化率的变化。结果:动员组外周血单个核细胞计数明显升高,其余各组无明显变化。与手术组比较,术后第 7 天动员组静脉血栓内炎性细胞数量明显增多,第 14 天,血栓的机化范围更广,血栓机化率有显著性差异。结论:骨髓干细胞动员促进了血栓的溶解、吸收过程。

【关键词】深静脉血栓;骨髓干细胞动员;集落刺激因子

【中国图书分类法分类号】R654.4 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-11-22

Effect of bone marrow stem cell mobilization in resolusion of deep vein thrombosis

CHEN Yikuan, et al

(*Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the effect of bone marrow stem cell mobilization in resolution of deep vein thrombosis. *Methods*: The SD adult rats were randomly divided into normal, sham, surgical and mobilization group (with subcutaneous injection of rhG-CSF). The peripheral blood mononuclear cell count, pathological change and thrombus organization rate in different time were examined. *Results*: The peripheral blood mononuclear cell count in mobilization group was significantly elevated, and there was no significant change in other groups. Compared with surgical group, there were more inflammatory cells in thrombus of mobilization group at 7th postoperative day, and the organization area of thrombus was wider and the organization rate was significantly different in mobilization group at 14th postoperative day ($P<0.05$). *Conclusion*: The bone marrow stem cell mobilization contribute to the resolution of deep vein thrombosis.

【Key words】Deep vein thrombosis; Bone marrow stem cell mobilization; Colony-stimulating factor

深静脉血栓形成(DVT)是周围血管外科常见疾病,随着人们生活水平的提高,近年来发病率明显上升。促进血栓的早期溶解、吸收有助于血栓的治疗。目前研究发现,静脉血栓内的中性粒细胞、单核细胞、内皮细胞部分来自骨髓,认为骨髓中的干细胞参与了血栓的机化、吸收[1]。本研究拟探讨骨髓干细胞动员对血栓机化、吸收的促进作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 选用清洁级 SD 大鼠 48 只,雌雄各 24 只,8 周龄,体重(190 ± 10)g,重庆医科大学实验动物中心提供。

1.1.2 实验仪器 全自动血细胞分析仪 (Syex XT-2000i)。OLYMPUS CH 型光学显微镜(日本)。生物医学图象分析系统(北航 CM-2000B 型)。

1.2 方法

1.2.1 下腔静脉血栓模型的建立 参照 Modarai[1]方法加以改进。SD 大鼠在新环境下适应性喂养 1 周后,采用 10%水合氯醛(350mg/kg 体重)腹腔内麻醉,取仰卧位,四肢外展固定,腹部皮肤消毒,正中切口进腹。显露左肾静脉以下下腔静脉并结扎其属支,用神经血管钳阻断下腔静脉 1min,松开 30s,再阻断 1min,顺下腔静脉放置 5-0 聚丙烯缝线,以 4-0 丝线于左肾静脉下方结扎下腔静脉和缝线,取出聚丙烯缝线,缝合腹壁。术后动物自由饮水,正常饲养,不用抗生素,大鼠均存活。

1.2.2 分组 大鼠随机分为正常组、假手术组、手术组、动员组。前两组各 8 只,后两组各 16 只。假手术组大鼠下腔静脉未行缩窄及阻断,余处理同手术组。动员组为模型鼠术后连续 7 天在腹部皮下注射重组人粒细胞集落刺激因子

作者介绍:陈以宽(1972-),男,硕士,讲师,
主要研究方向:周围血管疾病的干细胞治疗。

维普资讯 http://www.cqvip.com

(rhG-CSF)25 μg/kg，正常组、假手术组、手术组同时在腹部皮下注射等量生理盐水。

1.2.3 观测指标与方法 外周血单个核细胞计数：于术前半小时、术后 1 天、3 天、5 天、7 天、10 天，乙醚麻醉后经尾静脉采血 1ml 抗凝。以全自动血细胞计数分析仪检测白细胞总数，显微镜下计数单个核细胞比例。

病理组织形态学观察：术后 7 天、14 天，以水合氯醛麻醉。经原腹部切口打开腹腔，解剖下腔静脉，将手术组和动员组形成血栓的一段下腔静脉连同其内部的血栓一同切下，放于 4%多聚甲醛溶液中固定过夜，石蜡包埋、切片，OLYMPUS CH 型光学显微镜下观察。

血栓机化率测定：采用医学图像处理系统对血栓机化情况进行分析。取间隔 50 μm 的血栓病理组织切片 3 张，于 100 倍显微镜下选定、摄取血栓的图像，输入计算机图像分析系统，在系统屏幕上，测定血栓中机化部分的面积和血栓总面积，计算二者比值的百分数，算出 3 张切片的平均百分数，即为该标本的血栓机化率。

1.2.4 统计学处理 所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示，应用 SPSS 10.0 软件进行分析，显著性差异水平为 $P<0.05$。

2 结 果

2.1 外周血单个核细胞计数（见表 1）。

表 1 外周血单个核细胞计数（$\bar{x}\pm s$，n=8，1×10⁹/L）

时 间	正常组	假手术组	手术组	动员组
术前半 h	1.3±0.3	1.4±0.2	1.2±0.3	1.4±0.4
术后 1d	1.4±0.3	1.5±0.1	1.6±0.2	1.5±0.3
术后 3d	1.3±0.2	1.5±0.3	1.7±0.2	2.1±0.3
术后 5d	1.4±0.3	1.4±0.2	1.5±0.3	3.1±0.2
术后 7d	1.3±0.2	1.3±0.3	1.2±0.4	4.4±0.3
术后 10d	1.4±0.1	1.3±0.2	1.4±0.3	1.5±0.2

表 1 显示：正常组外周血单个核细胞计数没有变化；假手术组、手术组术后外周血单个核细胞计数稍有升高，很快恢复正常，但没有显著性差异；动员组术后外周血单个核细胞计数逐渐升高，直到动员剂应用的术后第 7 天达最高，至第 10 天时已基本恢复正常，从术后第 3 天开始至第 7 天，动员组与手术组有显著性差异 $P<0.05$。

2.2 病理组织形态学观察

手术组、动员组大鼠均形成血栓。动员组与手术组比较，术后第 7 天时，主要表现为静脉血栓内炎性细胞数量明显增多；术后第 14 天时，动员组血栓的机化范围更广，再通血管增多。

2.3 血栓机化率（见表 2）

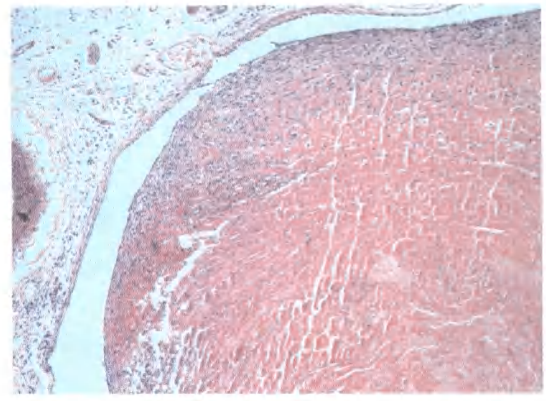


图 1 手术组术后第 14 天血栓机化情况，HE×100

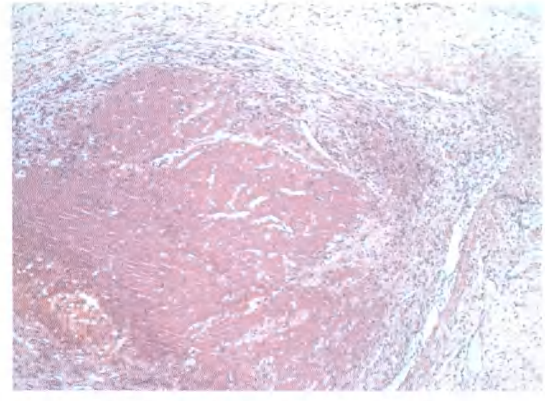


图 2 动员组术后第 14 天血栓机化情况，HE×100

表 2 各组血栓机化率结果（%）

组别	n	血栓机化率
手术组术后第 7d	8	15.6±2.3
动员组术后第 7d	8	18.1±3.5
手术组术后第 14d	8	63.2±8.6
动员组术后第 14d	8	89.5±5.6

注：术后第 7 天与手术组比较：t=1.68，$P>0.05$；术后第 14 天与手术组比较：t=7.25，$P<0.01$。

手术组、动员组术后第 14 天血栓机化情况见图 1、图 2。

3 讨 论

深静脉血栓常常引起慢性并发症，使治疗费用高，疗效差。目前国内外深静脉血栓的非手术治疗主要是抗凝、溶栓、祛聚等措施，抗凝治疗是深静脉血栓的标准治疗方案，抗凝、祛聚的目的是防止新的血栓形成，却并不能去除已经形成的血栓。溶栓治疗虽然能将形成的血栓溶解，但血栓形成后阻塞血管，存在于血循环中的药物只能与阻塞血管的血

维普资讯 http://www.cqvip.com

栓的两面接触，药物很难到达血栓内部，其溶栓作用就相当有限，因此机体内静脉血栓的最终吸收、溶解主要是依赖于机体本身的慢性自然溶解机制。如果机体对血栓的吸收、溶解彻底，血管可完全再通，否则血管狭窄或闭塞。机体对静脉血栓的吸收、溶解即是血栓的机化过程，随着血栓的机化，嗜中性粒细胞、单核细胞、内皮细胞进入血栓中。在机化的早期阶段，血栓收缩，血管壁与血栓间形成裂隙，随着时间的延长裂隙逐渐增大，内皮细胞逐渐覆盖裂隙，同时血栓内新生血管形成，裂隙及新生血管接合并增大形成管道，血流通过管道实现血管再通。因此增加嗜中性粒细胞、单核细胞、内皮细胞进入血栓中可能有助于血栓的溶解、吸收，实现血管的再通。

静脉血栓的建立方法有多种，包括结扎静脉血管，化学药物或放射线损伤静脉等，本实验采用静脉壁损伤联合静脉缩窄建立静脉血栓模型，手术组、动员组大鼠均形成血栓，表明该动物模型建立方法稳定。静脉缩窄使血液流动缓慢，内皮细胞损伤启动凝血，最终形成血栓。该法比较简单，类似于人体的 DVT 过程，有利于研究血栓的再通。

虽然大鼠与人有种属差别，但 rhG-CSF 可以安全有效的应用于大鼠。目前人们研究粒细胞集落刺激因子动员大鼠骨髓干细胞时通常均选用 rhG-CSF[2]。本实验显示，rhG-CSF 连续动员骨髓 7 天后，周围血中白细胞总数逐渐升高，在第 7 天达到最高，同时单个核细胞所占的比例也在相同时间达到最高，而在第 10 天时白细胞总数和单个核细胞所占的比例恢复到了正常。

重组的人粒细胞集落刺激因子几乎可动员骨髓中的各类干细胞入血，入血后存在于外周血的单个核细胞中。本实验应用 rhG-CSF 后，外周血中单个核细胞的数量显著上升，提示其骨髓动员的效果好。G-CSF 不仅可动员骨髓干细胞，而且还促进其分化和植入，抑制其凋亡，增加基质金属蛋白酶的表达[3]。G-CSF 虽然对单核细胞的分化增植可能没有多大作用，但能有效动员骨髓单核细胞入血[4]。G-CSF 的这些作用可能有助于增加嗜中性粒细胞、单核细胞、内皮细胞进入血栓中，促进血栓的溶解、吸收及再通。

本研究显示，在 rhG-CSF 动员骨髓干细胞后，血栓中炎性细胞数量增加，血栓机化增快，再通血管的形成增多。可见通过 rhG-CSF 动员骨髓干细胞促进了血栓的溶解、吸收过程。Modarai[1]等人研究发现表达内皮标记的骨髓祖细胞在术后 7 天出现在血栓的周边区域，14 天时贯穿于血栓的整个区域，同时这些细胞表达巨噬细胞表型，但是骨髓来源的祖细胞并未排列在血栓内的以及血栓与血管壁之间形成的再生管腔表面。因此他推测血栓中来源于骨髓的祖细胞刺激了血栓溶解的再生血管过程。同时用绿色荧光蛋白转基因小鼠的骨髓替代正常小鼠骨髓后发现，血栓中绿色荧光蛋白阳性的大部分细胞表达内皮细胞标记物 VEGFR2，3/4 的骨髓细胞表达巨噬细胞标记物 CD68。目前在人体及动物的静脉血栓中都观察到血栓的再血管化主要出现在巨噬细胞密度高的区域。Misao[5]等人研究发现 G-CSF 动员可增加心肌梗死区骨髓来源的巨噬细胞的聚集。Singh 等人研究显示尿激酶型血纤维蛋白溶酶原激活物基因敲除的小鼠腔静脉血栓的溶解及再管化受到明显抑制，血栓中细胞的数量在术后 14 天不到正常小鼠的 1/5，聚集峰值时间延迟在术后 28 天(正常为术后 14 天，到术后 28 天时血栓的机化溶解及再管化以基本完成，由含有大量新生血管和胶原沉积的高度机化的细胞结构组成)。但是将正常小鼠的骨髓移植给尿激酶型血纤维蛋白溶酶原激活物基因敲除的小鼠后，血栓的机化溶解过程完全恢复，同时正常小鼠移植了尿激酶型血纤维蛋白溶酶原激活物基因敲除小鼠骨髓后血栓的机化溶解过程受到损害。因此认为增强单核细胞尿激酶型血纤维蛋白溶酶原激活物的活性或者增强骨髓单核细胞的动员可能为静脉血栓提供新的治疗。目前我们正着手研究 rhG-CSF 动员骨髓干细胞后，血栓中巨噬细胞密度及功能的变化，以探讨 rhG-CSF 动员后血栓的溶解、吸收过程增加是否与巨噬细胞的作用有关。

参 考 文 献

[1] Modarai B, Burnand KG, Sawyer B, et al. Endothelial progenitor cells are recruited into resolving venous thrombi[J].Circulaton,2005;111:2645-2653.

[2] Lehrke S,Mazhari R,Durand DJ,et al.Aging impairs the beneficial effect of granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor on post-myocardial infarction remodeling[J].Circ Res,2006;99:553-560.

[3] Takagi Y,Yoshiyama M,Omura T,et al.Effects of granulocyte-colony stimulating factor on cardiac remodeling after myocardial infarction[J].Osaka City Med J,2005;51:43-50.

[4] Fraser AR,Cook G,Franklin IM,et al.Immature monocytes from G-CSF-mobilized peripheral blood stem cell collections carry surface-bound IL-10 and have the potential to modulate alloreactivity [J].J Leukoc Biol,2006;80:862-869.

[5] Misao Y,Takemura G,Arai M,et al.Importance of *recruitment* of bone marrow-derived CXCR4+ cells in post-infarct cardiac repair mediated by G-CSF[J].Cardiovasc Res,2006;71:455-465.