DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.10.028
第25卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 10
2003年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2003

文章编号:1000-5404(2003)10-0903-04

论著

小剂量MIP-1α联合IL-8对培养人造血干/祖细胞的保护作用

陆 华[1],李招权[2],潘 静[2],彭贤贵[3],王庆余[3] (第三军医大学:[1]附属西南医院医教部;[2]医学检验系临床检验学教研室,重庆 400038;[3]附属新桥医院血液内科,重庆 400037)

提 要:目的 了解小剂量巨噬细胞炎症蛋白-1α(Macrophage inflammatory protein-α, MIP-1α)联合白细胞介素-8(Interleukin-8, IL-8)在大剂量化疗药物阿糖胞苷(Ara-C)存在的情况下,对正常造血干/祖细胞的体外保护作用。方法 取患者骨髓,离心分离单个核细胞,根据随机单位组方差分析设计(The random complete block design variance analysis),将每例标本分为空白组(不加MIP-1α和IL-8);10 ng/ml联合组(加入10 ng/ml的MIP-1α和IL-8);1 ng/ml联合组(加入1 ng/ml的MIP-1α和IL-8);单用MIP-1α组(加入20 ng/ml的MIP-1α);单用IL-8组(加入20 ng/ml的IL-8)。将所得细胞培养在含IL-3和GM-CSF的液体体系中,先后经MIP-1α和/或IL-8以及大剂量Ara-C处理(以上步骤简称为"Ⅰ期处理")。之后作胎盼蓝拒染实验,流式细胞仪计数各组$CD34^+$细胞,Ⅱ期液体培养,集落培养,以了解经Ⅰ期处理后不同组别中正常造血干/祖细胞的存活情况及增殖能力。部分标本在Ⅰ期处理时只经MIP-1α和/或IL-8处理,不经Ara-C处理,用流式细胞仪检测所得细胞的周期分布。结果 10 ng/ml浓度下MIP-1α与IL-8联合组中,无论是Ⅱ期液体培养细胞生长情况、集落生长情况,还是$CD34^+$细胞计数,均高于其它组;而周期分析结果则表明,10 ng/ml MIP-1α和IL-8联合组中的G_0/G_1期细胞低于处理前组而高于其它对照组。结论 10 ng/ml浓度的MIP-1α与相同浓度的IL-8联合使用,能相互协同,将$CD34^+$细胞抑制在G_0/G_1期,进而增强正常$CD34^+$细胞抗Ara-C的作用。

关键词:MIP-1α;IL-8;造血干/祖细胞;细胞保护
中图法分类号:R329.2;R392.11 文献标识码:A

Protective role for hematopoietic stem/progenitor cells of low dose MIP-1α combined with IL-8 *in vitro*

LU Hua, LI Zhao-quan, PAN Jing, PENG Xian-gui, Wang Qing-yu (Department of Hospital Affairs, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the protective effects of low dose macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1α) combined with interleukin-8 (IL-8) on hematopoietic stem/progenitor cells against the cytotoxicity of high dose chemotherapeutic drug Ara-C (80 mg/L) *in vitro*. **Methods** Bone marrow hematopoietic cells were divided into five groups: control group, 10 ng/ml MIP-1α combined with 10 ng/ml IL-8 group, 1 ng/ml MIP-1α combined with 1 ng/ml IL-8 group, 20 ng/ml MIP-1α group and 20 ng/ml IL-8 group. These cells were pretreated with MIP-1α and/or IL-8 of different concentrations in liquid system containing IL-3 and GM-CSF, and then incubated with Ara-C (80 mg/L) ("first stage treatment"). To know the proliferation of those
ber of the living cells after second liquid system culture for 7 days and CFU-GM, CFU-E and CFU-Mix in 0.9% methyl cellulose system were counted. The number of $CD34^+$ cells and cell cycle were determined by FCM. **Results** The number of viable cells in second stage liquid system, the colony forming units of CFU-GM, CFU-E and CFU-Mix, and the number of $CD34^+$ cells of 10 ng/ml MIP-1α combined with IL-8 group were significantly higher than those in other groups. Cells at G_0/G_1 phase in the group treated with MIP-1α and IL-8 at the concentration of 10 ng/ml were lower than those of the pretreated group but significantly higher than those in other groups. There were no significant differences between other groups. **Conclusion** MIP-1α combined with IL-8 at the concentration of 10 ng/ml can protect human hematopoietic stem/progenitor cells against the cytotoxicity of high dose Ara-C *in vitro* by the inhibition of $CD34^+$ cells at G_0/G_1 phase.

Key words: macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1α); interleukin-8 (IL-8); cytoprotection; hematopoietic stem/progenitor cells

目前,在恶性肿瘤、尤其是白血病的化疗过程中,如何选择性地保护正常的造血干/祖细胞,一直缺乏有效的方法。我们通过研究体外小剂量(1 ng/ml或10

作者简介:陆 华(1972-),男,重庆市人,硕士,主治医师,讲师,主要从事造血干/祖细胞的保护方面的研究,发表论文8篇。电话:(023)68754015
收稿日期:2002-06-14;修回日期:2002-12-25

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

ng/ml)MIP-1α 联合 IL-8 在大剂量化疗药物阿糖胞苷(80 mg/L Ara-C)存在的环境中,对人正常早期造血干/祖细胞($CD34^+$细胞)的保护作用,探讨二者联合用于临床白血病患者大剂量化疗的可能性,以期为临床提供一种目前在国内技术条件下能实现的积极主动,安全可靠的造血干/祖细胞保护方案,并为今后这两种细胞因子的临床应用奠定实验基础。

1 材料和方法

1.1 标本来源

35 例骨髓标本均取自新桥医院住院和门诊病人,男 21 例,女 14 例,年龄 4~62 岁,平均年龄 36 岁。其中急性非淋巴细胞白血病(AML)M_1 1 例(化疗后)、M_2 4 例(3 例化疗后,1 例初诊)、M_3 6 例(3 例化疗后,3 例初诊)、M_5 1 例(化疗后);慢性粒细胞白血病(CGL)2 例(初诊);急性淋巴细胞白血病(ALL)L_1 2 例(均为化疗后)、L_2 2 例(1 例化疗后,1 例初诊);慢性淋巴细胞白血病(CLL)1 例(化疗后);何杰金淋巴瘤(HL)1 例(化疗后);非何杰金氏淋巴瘤(NHL)3 例(1 例化疗后,1 例放化结合治疗后,1 例初诊);骨髓异常增生综合征(MDS)2 例(化疗后);缺铁性贫血(IDA) 5 例;贫血待查 2 例;发热待查 1 例;溶血性贫血 1 例;肝硬化 1 例。35 例标本中,15 例只做周期分析。

1.2 材料和方法

1.2.1 材料 DMEM(高糖)培养液(Gibaco 公司 美国);小牛血清、马血清(Hycloon);rhMIP-1α(PEPROTECH EC LTD England);RhIL-8、L-谷氨酰氨(邦定泰克公司);甲基纤维素(SIGMA);GM-CSF、SCF、Epo、IL-3 由日本麒麟公司馈赠;小鼠抗人 CD34(BioGene 公司);FITC 标记山羊抗小鼠 IgG(SIGMA);淋巴细胞分离液(TBD 生物技术中心)。

1.2.2 分组 根据随机单位组方差分析设计,每例标本分为空白组(不加 MIP-1α 和 IL-8);10 ng/ml 联合组(加入 MIP-1α 和IL-8 各 10 ng/ml);1 ng/ml 联合组(加入 MIP-1α 和 IL-8 各 1 ng/ml);MIP-1α 组(加入 20 ng/ml 的 MIP-1α);IL-8 组(加入 20 ng/ml 的 IL-8)。

1.2.3 方法

1.2.3.1 细胞分离及Ⅰ期液体培养 经肝素抗凝处理的骨髓与等量的 DMEM 液混合后,用淋巴细胞分离液分离(1 500 r/min,离心20 min)提取单个核细胞。DMEM 液洗涤 3 遍(每遍1 000 r/min,离心 5 min),0.4% 台盼蓝染色,确定细胞活力均在 95%以上(作 $CD34^+$细胞计数和周期分析的标本此时可取出适量细胞,作为处理前组)。然后配制基础液体培养体系,体系总体积 8 ml,各成分在体系中的终浓度为:胎牛血清(10% V/V)、马血清(10% V/V)、牛血清白蛋白(1% W/V)、L-谷氨酰氨(3 mmol/L)、IL-3 (100 U/ml)、GM-CSF(100 U/ml)、细胞浓度(2×10^6/ml)、DMEM(适量,补足 8 ml)。

上述基础液体培养体系分成 5 组,每组 2 ml,再按分组分别加入MIP-1α 和/或 IL-8,培养 24 h 后(作周期分析的标本取出作上机前处理,无须后续实验),各组均加入阿糖胞苷(80 mg/L),继续培养 24 h 后进入下一步实验。

1.2.3.2 集落培养(半固体培养体系配置) 粒-巨噬细胞集落(CFU-GM)、红细胞集落(CFU-E)和混合细胞集落(CFU-Mix)培养体系中均含有 L-谷氨酰氨(2 mol/L)、IL-3(100 ng/ml)、青霉素(100 U/ml)、链霉素(100 U/ml)、牛血清白蛋白(1% W/V)、胎牛血清(10% V/V)和甲基纤维素(0.9% W/V),细胞浓度为2×10^5/ml,加 DMEM 调节体系体积。各种集落培养体系的不同成分如表 1 所示。

表1 各种集落培养体系的不同成分

Tab 1 Different contents of clonal culture system in different groups

Content	CFU-GM system	CFU-E system	CFU-Mix system
2-ME			10^{-5} mol/L
EPo		2 U/ml	2 U/ml
GM-CSF	100 ng/ml		100 ng/ml
SCF			100 ng/ml
Horse serum(ml/L)	200	100	100
Total volume of system	1 ml	0.5 ml	0.5 ml

CFU-GM 用 24 孔板培养,每孔 0.5 ml;CFU-E、CFU-Mix 用 96 孔板培养,每孔 0.2 ml。每份标本作两孔。培养条件为:37 ℃,5%CO_2,饱和湿度。3 d 后开始计 CFU-GM 和 CFU-E 集落数,7 d 后终止培养;10 d 后开始计 CFU-Mix 集落数,14 d 后,终止培养。集落判断标准:CFU-GM≥35 个细胞;CFU-E≥8 个细胞;CFU-Mix ≥10 个细胞。

1.2.3.3 Ⅱ期液体培养 Ⅱ期液体培养体系除细胞浓度为2×10^5/ml 外,其余配制同Ⅰ期液体培养,7 d 后终止培养,取出作台盼蓝染色及细胞计数。

1.2.3.4 $CD34^+$细胞计数 将经 Ara-C 处理后的各组细胞洗涤固定(70%的乙醇固定 24 h 以上)后,洗掉固定剂,调整细胞浓度至1×10^5/ml,加稀释的小鼠抗人 CD34 抗体(1/50 稀释),4 ℃过夜,0.01 mol/L PBS 洗,150× g,离心 5 min,重复 2 次,加 FITC 标记的羊抗小鼠 IgG(1/30 稀释),4 ℃孵育 30 min,洗涤,150× g,离心 10 min,重复 2 次。尽快送检。检测门电压 662,紫外光激发,计数 10 000 个细胞,取阳性细胞的百分率。

1.2.3.5 细胞周期分析 细胞的固定及洗涤同 $CD34^+$细胞计数,调整细胞浓度致1×10^5/ml,PI 避光染色 15 min,马上检测。每份标本收集 5 000 个细胞,用相应的程序分析收集到的细胞周期分布。

1.3 统计学处理

所得数据用随机单位组设计方差分析进行处理。

2 结果

2.1 液体培养结果

经Ⅰ期液体培养后,各组活细胞数无显著差异($P>0.05$),见表 2。而对Ⅱ期液体培养前后的活细胞差数进行比较(表 2),结果则表明,10 ng/ml 浓度下,MIP-1α 和 IL-8 联合组培养后活细胞增加明显高于其它组($P<0.05$),其余各组之间,差异不显著($P>0.05$)。

2.2 集落形成实验结果

10 ng/ml 联合组无论是 CFU-GM、CFU-E 还是 CFU-Mix 的生长情况均优于其它组($P<0.05$),不仅表现在最终的集落总数上,也表现在集落恢复的速率上。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表2　经Ⅰ期、Ⅱ期液体培养后各组细胞的增殖情况（$\times 10^5$/ml，$\bar{x}\pm s$）

Tab 2　Cell growth of different groups in liquid system（$\times 10^5$/ml，$\bar{x}\pm s$）

Group	Stage Ⅰ	Stage Ⅱ
MIP-1α＋IL-8(10 ng/ml)	5.75±3.66	11.19±9.83**
MIP-α＋ IL-8(1 ng/ml)	5.93±4.11	2.84±2.65
MIP-1α(20 ng/ml)	5.23±3.38	2.66±2.43
IL-8(20 ng/ml)	4.86±3.01	2.39±2.06
Control	5.11±3.42	2.03±1.87

**：$P<0.01$ *vs* control

2.3　流式细胞仪 $CD34^+$ 细胞计数

流式细胞仪 $CD34^+$ 细胞计数结果显示，10 ng/ml 浓度下，联合组 $CD34^+$ 细胞数明显低于处理前组而高于其它组（$P<0.05$），见表3。

表3　各组 $CD34^+$ 细胞计数以及 G_0/G_1 细胞比例（%，$\bar{x}\pm s$）

Tab 3　$CD34^+$ cell number and cells in G_0/G_1 phase of different groups（%，$\bar{x}\pm s$）

	$CD34^+$ cell number	Cells in G_0/G_1 phase
Pretreated	4.80±6.84*	93.80±9.22**
MIP-1α＋IL-8(10 ng/ml)	2.78±3.36*	84.70±9.36**
MIP-α＋ IL-8(1 ng/ml)	0.92±1.48	68.10±7.12
MIP-1α(20 ng/ml)	0.90±1.43	67.20±6.33
IL-8(20 nng/ml)	0.95±1.38	70.60±9.14
Control	1.00±1.52	69.40±8.67

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* control

2.4　细胞周期分析

周期分析结果显示，处理前组与其它组比较（10 ng/ml 联合组除外），相差非常显著（$P<0.01$），即处理前组 G_0/G_1 期细胞明显高于其它组。处理前组与 10 ng/ml 联合组比较，差异显著（$P<0.05$），处理前组 G_0/G_1 期细胞高于 10 ng/ml 联合组。10 ng/ml 联合组与其它处理组比较，10 ng/ml 联合组 G_0/G_1 期细胞明显高于其它组（$P<0.01$）。其余各组之间，相差不显著（$P>0.05$），见表3。

3　讨论

巨噬细胞炎症蛋白-1α（Macrophage inflammatory protein-1 alpha，MIP-1α）是一种多细胞来源的趋化因子，根据其分子中前两个半胱氨酸残基的位置关系划分为 C-C 亚群[1]。近年的研究发现它同时也是一种造血负调控因子，能够特异性地将正常 $CD34^+$ 细胞抑制于 G_0/G_1 期，而对于表达 MIP-1α 受体的白血病细胞却无此作用[2,3]。这种特异性的抑制作用提示可将其用于正常造血干/祖细胞的保护。但在体外，MIP-1α 对于正常 $CD34^+$ 细胞的最小有效抑制浓度为 100 ng/ml。这样的浓度若用于体内，必然引起不同程度的炎症反应，另外，MIP-1α 在＞20 ng/ml 的浓度下会发生自发性的聚合而降低其生物活性[4]。正是因为上述原因限制了 MIP-1α 在临床上的直接使用。

白细胞介素-8（Interleukin-8 IL-8）也是一种多细胞来源的趋化因子，属于 C-X-C 亚群[5,6]。IL-8 也是一种造血负控调因子，Broxmeyer 等[7]用 IL-8 受体缺陷型小鼠与正常小鼠对照，前者的髓系祖细胞在 IL-8 存在的条件下，不受抑制，而后者则受到明显抑制，从而证明了 IL-8 的造血负调控作用。

我们以前的研究表明，10 ng/ml 浓度下，MIP-1α 与 IL-8 联合使用，在体外就能够很好地抑制人骨髓造血细胞集落的形成[8]，这种增殖抑制作用在化疗药物存在得情况下，能否转变成为对正常造血干/祖细胞得保护作用呢？本实验通过将 MIP-1α 与 IL-8 在两种不同浓度下（1 ng/ml 和 10 ng/ml）联合，同时设立单用 MIP-1α 对照组，单用 IL-8 对照组和空白对照组，分别作用于骨髓单个核细胞，观察其中的造血干/祖细胞在大剂量（80 mg/L）周期特异性化疗药物阿糖胞苷（Ara-C）作用下的生存情况。结果经过Ⅰ期处理后，各组之间细胞活力均无显著差异（$P>0.05$）。这只是一个粗略的结果，造血干/祖细胞的数量本来就很少，体系中的其它细胞则相对较多，因此即便是前者被保护下来，也很难在此时直接从数量上体现出来。所以这一结果还不能说明 MIP-1α 和 IL-8 对造血干/祖细胞是否具有保护作用。后续实验则进一步表明 10 ng/ml 浓度下，MIP-1α 与 IL-8 联合则对正常造血干/祖细胞有明显的保护作用，无论Ⅱ期液体培养、集落培养、以及 $CD34^+$ 细胞直接计数的结果均显示，联合组与其它组的差异显著（$P<0.05$）。尤其是混合集落的生长结果，更能说明具有多向造血功能的造血细胞受到了较好的保护。另外，在集落培养后期，10 ng/ml 浓度下 MIP-1α 与 IL-8 联合组的集落增长明显快于后期，因为越早期的造血干细胞形成集落的时间越晚，所以该结果提示早期的造血细胞在 MIP-1α 和 IL-8 的联合作用下受到了很好的保护。我们的实验还验证了 MIP-1α 与 IL-8 在对正常造血干/祖细胞保护作用中存在明显的协同作用，因为 MIP-1α 与 IL-8 联合，在 10 ng/ml 的浓度下就有了确切的正常造血干/祖细胞保护作用，而当它们单用时，其浓度即便是加大一倍（20 ng/ml），两者也都未表现出对正常造血干/祖细胞的保护作用。另外，我们的实验结果初步表明，MIP-1α 与 IL-8 联合使用对正常造血干/祖细胞的保护作用是通过将它们抑制于 G_0/G_1 期实现的。

尽管 MIP-1α 与 IL-8 联合使用，在体外对正常造血干/祖细胞的保护作用是确切的，但在体内作用如何，需要深入的研究；另外，虽然尚无文献报道两种因子单独使用对白血病细胞有增殖抑制作用，而且我们的实验中，有相当部分是白血病患者的骨髓，我们在分离单

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

个核细胞时,并未将白血病细胞剔除,这些白血病细胞在实验中经历了与正常造血干/祖细胞同样的处理,无论是哪种浓度作用后,在后续的集落培养中,我们几乎看不到白血病细胞丛的生长(白血病细胞通常很难长成集落,只能形成细胞丛),但如果要得出两者联合对白血病细胞没有增殖抑制作用得结论,仍需要用白血病细胞株来进一步证实。

参考文献:

[1] Wolpe S D, Cerami A. Macrophage inflammatory proteins 1 and 2: members of a novel superfamily of cytokines[J]. Faseb J, 1989, 3(14): 2565—2573.

[2] Lord B I, Dexter T M, Clments J M, *et al*. Macrophage-inflammatory protein protects multipotent hematopoietic cells from the cytotoxic effects of hydroxyurea *in vivo*[J]. Blood, 1992, 79(10): 2605—2609.

[3] Owen LYNCH P J, Adans J A, Brereton M L, *et al*. The effect of chemokine rh MIP-1α and a non-aggregating variant BB-10010 on blast cells from patients with acute myeloid leukemia[J]. Br J Haematol, 1996, 95: 77—84.

[4] Bernstein S H, Eares C J, Herzig R, *et al*. A randomize phase Ⅱ study of BB-10010 a variant of human macrophage inflammatory pratein-1α for patients receiving high-dose etopaside and cyclophosphamide for malignant lymphoma and breast cancer[J]. Bri J Haematol, 1987, 99: 888—895.

[5] Owen-Lynch P J, Czaplewski L G, Hunter M G, *et al*. The growth inhibitory role and potential clinical value of macrophage inflammatory protein 1 alpha in myeloid leukemias[J]. Leuk Lymphoma, 1998, 30(1-2): 41—53.

[6] 陈文杰. 血液分子细胞生物学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1993. 184—189.

[7] Broxmeyer H E, Cooper S, Cacalano G, *et al*. Involvement of Interleukin-8 (IL-8) receptor in negative regulation of myeloid progenitor cells *in vivo*: evidence from mice lacking the murine IL-8 receptor homologue[J]. J EXP MED, 1996, 184(5): 1825—1832.

[8] 陆 华, 潘 静, 李招权, 等. 小剂量MIP-1联合IL-8体外对人骨髓造血细胞集落形成的影响[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(2): 202—204.

(编辑 张大春)

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2003)10-0904-01

重庆市616例儿童牙病患者的调查分析

The survey and analysis of 616 child patients with tooth diseases in Chongqing

温秀杰, 熊 辉, 刘鲁川, 詹万德 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所口腔科, 重庆 400042)

为了解重庆地区儿童牙病的特点,为儿童牙病的防治提供参考依据,我们对616例门诊儿童牙病患者进行了调查分析,现报告如下。

1 材料收集

收集1998年10月至2000年10月来我院口腔内科门诊就诊的儿童病人616例,对年龄、性别、牙位和诊断进行统计。

2 结果

儿童患者共616例(患牙755颗),男性318例,占51.62%,女性298例,占48.38%。就诊儿童的病种和患牙牙位分布情况分别见表1、2。

表1 616例儿童患者的病种

病种	就诊例数	构成比(%)
龋病	254	41.23
牙髓病	172	27.92
根尖周病	132	21.43
非龋性牙体硬组织病	39	6.33
其他	19	3.09

表2 755颗患牙的牙位分布[例数(%)]

牙位	上颌(%)	下颌(%)
乳中切牙	8(1.06)	0(0.00)
乳侧切牙	1(0.13)	0(0.00)
乳尖牙	3(0.40)	0(0.00)
第一乳磨牙	106(14.04)	167(22.12)
第二乳磨牙	129(17.09)	161(21.32)
第一恒磨牙	39(5.17)	79(10.46)
其他	28(3.71)	34(4.50)

3 讨论

在牙位统计中,受累牙主要是第二乳磨牙、第一乳磨牙和第一恒磨牙,且下颌明显高于上颌。分析原因可能是:磨牙的窝沟多,自洁作用较前牙差;乳磨牙的牙颈部较窄,易嵌塞食物;下颌牙齿易滞留食物。调查中发现,有的乳磨牙在2岁时就发生了明显的龋坏,说明人们对乳牙的保健重视不够,甚至有种错误观念,认为乳牙迟早是要被替换的,是否发生龋坏影响不大。儿童时期是生长发育的关键时期,乳磨牙的过早龋坏以至缺失,不仅会造成恒牙的早萌或萌出不齐[1],而且不利于儿童的生长发育。调查还发现,第一恒磨牙就诊率也较高,有的6岁就开始发生龋坏,且随年龄增长呈上升趋势。说明第一恒磨牙也是这一时期龋病预防的关键。

(下转909页)

作者简介: 温秀杰(1973—),男,辽宁省本溪市人,硕士研究生,医师,主要从事脉冲Nd:YAG激光对牙齿粘结性能的影响方面的研究。电话:(023)68757368

收稿日期: 2001-03-12; 修回日期: 2001-06-07

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net