DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.02.012
第25卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 2
116 2003年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)02-0116-03

放射损伤对骨髓细胞间相互作用因素影响的研究

蒲晓允,陈晓莉,潘 静,李招权,邓 均,黄 辉,叶 勇 (第三军医大学医学检验系临床血液学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 了解放射损伤条件下骨髓细胞的生物力学特性及与细胞间相互作用的关系。方法 以6 Gy ^{60}Co照射昆明系小鼠制备动物模型,以细胞电泳法检测骨髓细胞的细胞电泳率,荧光探针法测定细胞膜微粘度,旋转法测细胞的粘附性,核孔滤膜法检测细胞的变形指数。结果 放射损伤后骨髓细胞的变形能力降低,细胞膜微粘度增加,粘附率降低,细胞电泳率降低。结论 放射线对骨髓细胞(包括基质细胞和造血细胞)的力学特性有显著影响,是放射损伤后造血功能减退的原因之一。

关键词:粘附性;膜流动性;细胞变形性;骨髓细胞
中图法分类号:R329.27;R331.22;R363.121 文献标识码:A

Effect of radiation injury on cell—cell interaction of bone marrow in mice

PU Xiao-yun, CHEN Xiao-li, PAN Jing, LI Zhao-quan, DENG Jun, HUANG Hui, YE Yong (Department of Hematology, Faculty of Medical Laboratory Technology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the biodynamic properties of bone marrow cells and the relation with cell-cell interaction in radiation injury mice. Methods Male Kunming mice were exposed to total body irradiation of 6Gy of gamma rays from ^{60}Co to establish animal model. Cell membrane electric charge, membrane fluidity, cell deformability, and cell adhesion were determined with electrophoresis, DPH probe, microporous membrane filter, and adhesion rate methods, respectively. Results The deformability, cell adhesion rate and membrane electric charge dramatically decreased, but bone marrow cell membrane microviscosity increased obviously after radiation injury at 1d, 3d and 7d. Conclusion Radiation has significant effect on the mechanic properties of bone marrow cells (including hematopoitic cells and stroma cells) after radiation injury. It may be one of reasons resulting in hematopoietic failure after radiation injury.

Key words: adhesion; membrane fluidity; cell deformability; bone marrow cells

骨髓细胞由骨髓造血细胞(Bone marrow hematopoietic cells, BMHCs)和骨髓基质细胞(Bone marrow stromal cells, BMSCs)两大类细胞组成。BMHCs与BMSCs间有非常密切的相互作用,这种作用对于调节BMHCS的增殖与分化有十分重要的意义[1,2]。其作用的形式主要表现为细胞间的粘附,聚集及细胞膜间的沟通,从而达到细胞间物质和信息的交流。放射损伤后无论是BMHCs还是BMSCs都有不同程度的结构和功能的改变,对细胞间的相互作用也将产生一定影响,本实验对放射损伤所致影响骨髓细胞间相互作用的因素(如粘附性、变形性、膜脆性、表面电荷等)进行了研究。

1 材料与方法

1.1 实验动物

昆明种小鼠85只(本校实验动物中心提供,雌雄各半),体重(22.01±0.71)g,随机分为对照与实验两组,实验组50只(照射后部分小鼠死亡,以30只用作实验),对照组小鼠35只,选定照射后1、7、15 d为检测点。

1.2 照射条件

^{60}Co γ射线全身一次性照射6 Gy,剂量率1.14~1.21 Gy/min,照射后普通喂养。

1.3 骨髓细胞的制备

将小鼠从股动脉放血致死,并将血放入肝素化小瓶中,收集分离血浆备用;分离出股骨,用RPMI1640液冲洗出骨髓,并使骨髓细胞呈分散状态,用Percoll液(比重1.081)经离心1 500 r/min,分离出单个核骨髓细胞,并用RPMI1640液洗涤两次备用。

1.4 细胞变形性测定

核孔滤膜细胞变形仪,核孔膜购自中科院核能物理研究所,孔径0.8 μm,计算细胞变形指数,并以此判断细胞的变形能力,详见文献[3]。

1.5 细胞膜性测定

将洗涤后的骨髓细胞悬浮于PBS(pH 7.4)中,细胞浓度2×10^6/ml,4 ml细胞悬液中加入2 μmol/L DPH液(荧光探针)10 μl,25 ℃孵育30 min,于荧光分光光度计上检测荧光偏振值,并计算

作者简介:蒲晓允(1963-),男,四川省南充市人,博士,副教授,主要从事血细胞生成与调控方面的研究,发表论文20余篇。电话:(023)68752312

收稿日期:2002-01-20;修回日期:2002-04-10

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

细胞膜流动性, 再换算成膜微粘度(η), 依据膜微粘度的大小判断膜刚性, 详见文献[4]。

1.6　细胞表面电荷测定

将洗涤后细胞悬浮于小鼠自体血浆中, 细胞浓度约为 1×10^4/ml, 吸入方形毛细血管中, 然后将毛细血管放入电压为 40 伏的电场中, 在细胞电泳仪的控制下, 细胞在电场中作来回泳动, 依据细胞在电场中泳动的快慢判断细胞表面电荷密度的大小, 即泳动越快, 电荷密度越大, 结果以电泳率表示。

1.7　细胞粘附性测定

将洗涤后的 BMHCs 和 BMSCs 悬浮于小鼠血浆中, 细胞浓度 1.0×10^6/ml, 吸取 1 ml 细胞悬液加入粘附瓶中, 放入旋转式细胞粘附仪上, 于 37 ℃下, 以 15 r/min, 旋转 15 min, 然后计数转前(AO)与转后(A)细胞悬液中细胞浓度, 并依据以下公式计数粘附率(AI), AI=(AO−A)/AO×100%。

1.8　统计学方法

上述实验数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 t 检验分析组间差异的显著性。

2　结果

2.1　放射损伤后骨髓细胞变形能力改变

放射损伤后 1、7 及 15 d 骨髓细胞的变形指数较对照组显著升高($P<0.05$), 即它们的变形能力均明显降低, 15 d 时恢复至对照组水平, 结果见表 1。

表 1　骨髓细胞变形指数改变($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Changes of deformability index of bone marrow cells($\bar{x}\pm s$)

Group	n	1 d	7 d	15 d
Control	30	0.82±0.11	0.77±0.09	0.74±0.08
Radiation	35	0.63±0.07△	0.58±0.10△	0.68±0.08

△: $P<0.05$ *vs* Control

2.2　放射损伤后骨髓细胞表面电荷变化

放射损伤后 1、7、15 d 骨髓细胞电泳率较对照组明显降低($P<0.05$), 但 15 d 时较 1 d 明显升高($P<0.05$), 结果见表 2。

表 2　骨髓细胞电泳率改变($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Changes of electrophoresis rate of bone marrow cells($\bar{x}\pm s$)

Group	n	1 d	7 d	15 d
Control	30	1.84±0.35	1.82±0.27	1.93±0.37
Radiation	35	1.40±0.23△	1.47±0.18△	1.75±0.22△*

△: $P<0.05$ *vs* Control; *: $P<0.05$ *vs* 1 d group

2.3　放射损伤对细胞膜微粘度性的影响

对照组与放射组各时相点细胞膜微粘度(η)值均较对照组略高, 显示有细胞膜微粘度升高, 即膜刚性增强, 但统计学分析无显著性差异, 结果见表 3。

2.4　放射损伤后对细胞粘附性的影响

放射损伤后各时相点, 骨髓细胞粘附率较对照组均显著降低, 且于对照组比较有非常显著的差异($P<0.01$)。表明放射线导致了骨髓细胞粘附能力的显著降低, 结果见表 4。

表 3　骨髓细胞膜微粘度改变($\bar{x}\pm s$)

Tab 3　Changes of membrane microviscosity of bone marrow cells($\bar{x}\pm s$)

Group	n	1 d	7 d	15 d
Control	30	0.269±0.021	0.271±0.011	0.264±0.015
Radiation	35	0.275±0.031	0.310±0.017	0.304±0.013

表 4　骨髓细胞粘附率改变($\bar{x}\pm s$)

Tab 4　Changes of adhesion rate of bone marrow cells($\bar{x}\pm s$)

Group	n	1 d	7 d	15 d
Control	30	35.37±1.25	33.25±2.17	32.14±2.68
Radiation	35	26.43±3.85	20.12±2.16△	26.73±2.15△

△: $P<0.05$ *vs* Control

3　讨论

骨髓细胞是一个十分混杂的细胞群体, 它由多种不同性质、不同功能的细胞组成, 一般这种关系将其分为骨髓造血细胞(BMHCs)和非造血细胞或骨髓基质细胞(BMSCs)两大类。BMSCs 与 BMSCs 间及 BMHCs 与 BMHCS 间的相互作用与骨髓细胞间物质和信号传递、造血细胞的增殖与分化、造血干细胞归巢(Homing)[5]及锚定(Anchor)[6]、血细胞释放[7]等有密切的关系。影响骨髓细胞相互作用的因素主要有三个方面: ①BMHCs 与 BMHCs 间的结构基础如紧密连接 cgap; ②作用于细胞间的各种类型的粘附分子, 如 VCAM-1、ICAM-1、FN、胶元分子等, 这些分子的量或种类的变化均可影响 BMHCs 与 BMSCs 间的相互作用[8]; ③细胞的生物力学特性, 如粘附性、变形性、膜脆性、表面电荷等。这些因素中的任何一种或几种因素发生变化都将导致骨髓细胞间相互作用关系的改变。以往对放射损伤后前两者的研究已有很多, 本研究主要对放射损伤后骨髓细胞的生物力学特性进行了研究。

细胞膜的流动性反映的是细胞膜中物质成分流动的难易程度, 流动性越大显示细胞膜成分在膜上相互交换或互变位置更容易, 亦即膜的脆性或刚性越低, 这种细胞要聚集或粘附在一起越容易。从表 3 看出, 放射损伤后骨髓细胞膜的微粘度各时相点较对照组均有所升高, 表明这些细胞膜的刚性增强, 将导致细胞聚集性和粘附性的降低。因为细胞膜的微粘度与膜酶的活性、膜的化学组成等因素有关, 且放射损伤后细胞 ATP 酶及乙酰胆碱酯酶活性的降低[9,10], 因此放射损伤后

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

细胞的膜微粘度会升高。

骨髓细胞一般均带有负电荷，细胞表面电荷密度的大小直接与细胞间的排斥力大小相关，即电荷密度越大，排斥力越大，则细胞不易结合到一起由于细胞表面电荷密度与细胞膜唾液酸含量的多少直接相关，因此膜唾液酸的含量决定了膜表面电荷的密度的大小。从表2可看出，放射损伤后细胞表面电泳率降低，显示表面电荷密度降低，这可能与在此种条件下神经氨酸酶活性的降低有关[11]。表面电荷的降低虽是细胞粘附或聚集的促进因素，但这一因素需与其他降低细胞间相互作用的因素进行综合评价，一般而言，决定细胞间相互作用的主导因素有二：一是粘附分子的多少，二是细胞的变形能力。虽然细胞表面电荷的多少可以影响细胞的粘附性或聚集性，但不是主导因素。

细胞的变形性又称细胞的变形能力，它是指细胞穿过某一比自身直径更小的通道的难易程度，它决定着细胞的形态及细胞间粘附或聚集的难易程度。细胞的变形能力受多方面因素的影响，如膜刚性、核浆比例、胞浆粘度及细胞的几何形状等。本实验结果显示放射损伤后各时相点细胞的变形指数均显著升高，表明细胞的变形能力降低了，而放射损伤对影响细胞变形能力的因素-膜刚性有直接的联系，前已述及这是由于细胞ATP酶及乙酰胆碱酯酶活性降低所致，同时引起细胞膜骨架的改变[12]，是放射损伤后骨髓细胞的变形能力降低的主要原因，理论上射线对细胞核浆比例，胞浆粘度的影响不大。

细胞的粘附性是细胞间粘附或聚集难易程度的直接反应，细胞对玻璃的粘附能力受细胞表面电荷的多少、细胞的几何形状、细胞的变形能力及细胞膜刚性的综合影响。表4结果显示放射损伤后各时相点细胞的粘附率显著降低，表明细胞的粘附力降低，降低的原因主要是前面讨论到的细胞变形能力降低，细胞膜刚性增强，及射损伤后细胞粘附表达降低有关[13]。粘附性的降低反映了放射损伤后细胞间相互作用力的减弱，当然细胞与玻璃的粘附性还不能完全等同于细胞间的粘附力，但这足以说明放射损伤已对细胞间的相互作用产生了不利影响。

放射损伤导致造血功能的多方面损害，本实验的研究表明放射对细胞的生物力学特性也可造成显著的影响，这可能与放射所致造血功能衰竭有直接的联系，因为无论是细胞变形能力的降低、膜刚性的增强，还是细胞粘附力的降低所产生的直接后果都是BMHCs与BMSCs，BMHCs与BMHCs间相互作用力的减弱，从而影响细胞间信息和物质的传递，进而影响BMHCs的增殖与分化，因此放射线对骨髓细胞生物力学特性的影响，在放射损伤造血重建中是值得关注的问题。

参考文献：

[1] Garrido S M, Appelbaum F R, Willman C L, *et al*. Acute myeloid leukemia cells are protected from spontaneous and drug-induced apoptosis by direct contact with a human bone marrow stromal cell line (HS-5)[J]. Exp Hematol, 2001, 29(4): 448—457.

[2] Cheung W C, Van-Ness B. The bone marrow stromal microenvironment influences myeloma therapeutic response *in vitro*[J]. Leukemia, 2001, 15(2): 264—271.

[3] 蒲晓允. 己酮可可碱对白血病粒细胞变形能力的影响[J]. 临床血液学杂志, 1995, 8(4): 164.

[4] 张世国，彭立义，冷贵生. 缺血脑卒中患者红细胞膜质微粘度及血清脂质分析[J]. 中华神经精神杂志, 1995, 28(6): 357—359.

[5] Jarvis L J, Maguire J E, LeBien T W. Contact between human bone marrow stromal cells and B phosphorylation of focal adhesion kinase, paxillin, and ERK2 in stromal cells[J]. Blood, 1997, 90(4): 1626—1635.

[6] Metz C N, Brunner G, Choi-Muira N H, *et al*. Release of GPI-anchored membrane proteins by a cell-associated GPI-specific phospholipase D[J]. EMBO J, 1994, 13(7): 1741—1751.

[7] Bellamy W T, Richter L, Sirjani D, *et al*. Vascular endothelial cell growth factor is an autocrine promoter of abnormal localized immature myeloid precursors and leukemia progenitor formation in myelodysplastic syndromes[J]. Blood, 2001, 97(5): 1427—1434.

[8] Weimar I S, Miranda N, Muller E J, *et al*. Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) is produced by human bone marrow stromal cells and promotes proliferation, adhesion and survival of human hematopoietic progenitor cells ($CD34^+$)[J]. Exp Hematol, 1998, 26(9): 885—889.

[9] Piasecka A, Ieyko W, Krajewska E, *et al*. Effect of combined treatment with perindoprilat and low-power red light laser irradiation on human erythrocyte membrane fluidity, membrane potential and acetylcholinesterase activity[J]. Scand J Clin Lab Invest, 2000, 60(5): 395—402.

[10] Dovrat A, Weinreb O. Effects of UV-A radiation on lens epithelial NaK-ATPase in organ culture[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999, 40(7): 1616—1620.

[11] Agafonov V I, Dygai A M, Boldyshev D A, *et al*. Gol'dberg-ED, The stimulating effect of sislic acid on the processes of postradiation hemopoietic regeneration[J]. Eksp Klin Farmakol, 1995, 58(4): 41—44.

[12] Suzuki Y, Tateishi N, Cicha I, *et al*. Decreased deformability of the X-ray-irradiated red blood cells stored in mannitol-adenine-phosphate medium [J]. Clin Hemorheol Microcirc, 2000, 22(2): 131—141.

[13] Grewe M, Stege H, Vink A. Inhibition of intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1) expression in ultraviolet B-irradiated human antigen-presenting cells is restored after repair of cyclobutane pyrimidine dimers[J]. Exp-Dermatol, 2000, 9(6): 423—430.

（编辑 薛国文）

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