DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.11.011

论著

文章编号:1000-5404(2002)11-1276-04

大剂量甲氨喋呤对小鼠骨髓基质细胞生物学特性的影响

李建军,梁后杰,胡绍毅 (第三军医大学附属西南医院肿瘤血液科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨大剂量甲氨喋呤(MTX)对小鼠骨髓基质细胞(BMSC)生物学特性的影响。方法 BALB/c小鼠按每千克体重经尾静脉注射MTX 0 mg(对照组)、10 mg(小剂量组)、40 mg(大剂量组),化疗后采取骨髓细胞进行分离培养,观察BMSC生长、成纤维细胞集落(CFU-F)、BMSC层粘附率和造血细胞混合集落的变化。结果 小剂量组化疗后不同时间上述指标与对照组无明显差异,而大剂量组化疗后第7天开始出现BMSC层粘附率显著下降,第14天后出现生长减慢、CFU-F形成能力和造血支持功能降低,第35天仍低于正常。结论 大剂量化疗可导致BMSC损伤,且损伤持续时间较长。

关键词:骨髓;基质细胞;化疗;甲氨喋呤
中图法分类号:R331.2;R979.12 文献标识码:A

Effects of high-dose methotrexate on biological properties of murine bone marrow stromal cells

LI Jian-jun, LIANG Hou-jie, HU Shao-yi (Department of Oncology and Hematology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the effects of high-dose methotrexate (MTX) on murine bone marrow stromal cells (BMSC). Methods Each mouse was injected through caudal vein with MTX of 0 mg/kg (control group), 10 mg/kg (low-dose group) or 40 mg/kg (high-dose group). After chemotherapy bone marrow cells were harvested and cultured, then growth of BMSC, number of colony forming unit-fibroblast (CFU-F), adhesive rate of BMSC and growth of colony forming unit-mixed hematopoietic cells on the BMSC layer were observed. Results The above-mentioned indexes of low-dose group were similar to those of the control group. In high-dose group, however, the adhesive rate of BMSC began to decrease significantly on the 7th day and the growth of BMSC slowed down, the number of CFU-F decreased and the ability to support hematopoiesis declined the 14th day. Until the 35th day the above-mentioned indexes were lower than those of the control group. Conclusion BMSC can be damaged by high-dose chemotherapy and the effects can last longer.

Key words: bone marrow; stromal cells; chemotherapy; MTX

化疗剂量强度与疗效的相关性理论是近年临床化疗的重要研究成果,也是临床开展大剂量化疗提高某些肿瘤根治率的重要理论依据。但即使是在造血干细胞移植或造血细胞因子支持下,大剂量化疗也可导致患者造血功能长期不能恢复[1]。鉴于骨髓基质细胞(BMSC)在造血调控中的重要作用[2],化疗药物可能导致BMSC损伤,从而引起造血重建功能的障碍。本研究就临床上广泛使用的化疗药物甲氨喋呤(Methotrexate,MTX)进行动物实验,探讨大剂量MTX对小鼠BMSC的影响,并分析其特点,为临床防治提供理论和实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康雄性BALB/c小鼠75只,清洁级,10~12周龄,体重(20±2)g,购自第三军医大学实验动物中心。

1.2 试剂

IMDM培养基、RPMI1640培养基、胎牛血清(Hyclone),马血清(郑州佰安),Percoll分离液(Pharmacia),甲氨喋呤(浙江万马,批号000705)。

1.3 动物分组及处理

小鼠75只,随机排列表法分为3组,每组25只,相对无菌饲养。对照组:MTX剂量为0;常规剂量化疗组(小剂量组):MTX剂量为10 mg/kg;大剂量化疗组(大剂量组):MTX剂量为40 mg/kg。药物行尾静脉注射,共注射1次,注射当日计为第0天。

1.4 骨髓单个核细胞(BMMNC)制备

分别于化疗后第7、14、21、28、35天颈椎脱臼处死小鼠5只,无菌分离双侧股骨、胫骨,去两侧骨端,用IMDM培养基反复冲洗骨髓腔制成骨髓单细胞悬液,以1∶1的比例顺离心管壁加在比重为1.082 g/ml的Percoll分离液表面,离心(2 000 r/min×15 min),吸取悬于分层界面的细胞,再离心洗涤3次,重新悬浮制成BMMNC悬液,鉴定活性、计数后备用。

1.5 细胞培养液制备

参照Dexter培养体系[3],IMDM培养基内含10%胎牛血清、10%马血清、10^{-6} mol/L氢化考的松、100 U/ml青霉素、100 U/ml链霉素,pH值在7.2至7.4之间。

1.6 CFU-F培养及计数

调整BMMNC浓度为4×10^5/ml,每孔1 ml接种于24孔培养板中,于37℃、5% CO_2、饱和湿度条件下培养。第7天半量换液,第14天终止培养,生理盐水洗涤,倒置显微镜下计数,40个左右梭形细胞的集落计为1个CFU-F[4]。

1.7 BMSC培养[4]

调整BMMNC浓度为2×10^6/ml,每孔1 ml接种于24孔培养板中,于37℃、5% CO_2、饱和湿度条件下培养。第3天全量换液,以后每周半量换液一次,同时进行形态学观察并定期照相记录。

作者简介:李建军(1972-),男,四川省蓬安人,博士,医师,主要从事肿瘤大剂量化疗下支持治疗的研究,发表论文10篇。电话:(023)68754000-73133

收稿日期:2002-05-21;修回日期:2002-08-26

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

1.8　BMSC 层粘附率测定

第 4 周 BMSC 层以 PBS 冲洗 2 次, 充分去除悬浮细胞, 然后各孔加入细胞浓度为 4×10^5/ml 含 20% 胎牛血清的正常 BALB/c 小鼠 BMMNC 悬液 1 ml, 再次培养 2 h 后轻轻冲洗 2 次, 收集并计数未粘附细胞, 按下述公式计算 BMSC 层对正常 BMMNC 的粘附率:

$$\text{BMSC 层粘附率}=\left(1-\frac{\text{未粘附细胞数目}}{4\times10^5}\right)\times100\%$$

1.9　BMSC 层上造血细胞混合集落培养

第 4 周 BMSC 层用 ^{60}Co γ 射线照射 15Gy, 轻轻洗涤 2 次, 然后各孔加入细胞浓度为 2×10^5/ml 的含 20% 胎牛血清的正常 BALB/c 小鼠 BMMNC 悬液 1 ml, 继续培养 7 d, 观察并记录造血细胞混合集落生长情况。

1.10　统计学分析

两组间均值比较采用 SPSS 11.0 进行独立样本 t 检验。

2　结果

2.1　CFU-F 计数

结果见表 1。小剂量组与对照组比较差异无显著性($P>0.05$); 大剂量组化疗后第 14、21、28、35 天 CFU-F 数目较对照组均有不同程度减少($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 而化疗后第 7 天 CFU-F 计数虽有减少, 但无统计学差别($P>0.05$)。

表 1　各组化疗后不同时间 CFU-F 计数的变化 (4×10^5 BMMNC, $n=5$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Changes of CFU-F after chemotherapy (4×10^5 BMMNC, $n=5$, $\bar{x}\pm s$)

Group	Time after chemotherapy				
	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d
Control	20.1±1.5	19.9±1.9	20.5±1.7	20.2±1.8	19.4±1.5
Low-dose	19.8±1.7	19.0±1.8	19.3±1.9	20.0±1.4	19.3±1.8
High-dose	18.5±1.9	16.5±1.7 *	12.3±1.9 **	15.0±1.3 **	16.7±1.3 *

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* Control

2.2　BMSC 形态学及生长情况

对照组不同时间所作 BMSC 培养, 细胞数目逐渐增多, 以梭形成纤维细胞为主, 胞体较大, 伪足明显, 呈旋涡状或平行样生长, 培养 4 周后细胞融合成单层; 小剂量组化疗后不同时间 BMSC 数目、形态在培养过程中与对照组比较无明显差别; 大剂量组化疗后第 7 天 BMSC 形态、数目与对照组相似, 化疗后第 14、21、28、35 天的 BMSC 在培养过程中细胞数目较对照组减少, 梭形成纤维细胞比例降低, 胞体较小较短, 排列散乱, 经 28 d 培养细胞融合较差, 尤以化疗后第 21 天 BMSC 生长最差, 见图 1。

2.3　BMSC 层对正常小鼠 BMMNC 的粘附率测定

结果见表 2。小剂量组粘附率与对照组比较无显著差异($P>0.05$); 大剂量组化疗后各时相点 BMSC 层粘附率均显著降低($P<0.01$)。

表 2　各组化疗后不同时间 BMSC 层粘附率的变化($n=5$, $\bar{x}\pm s$)

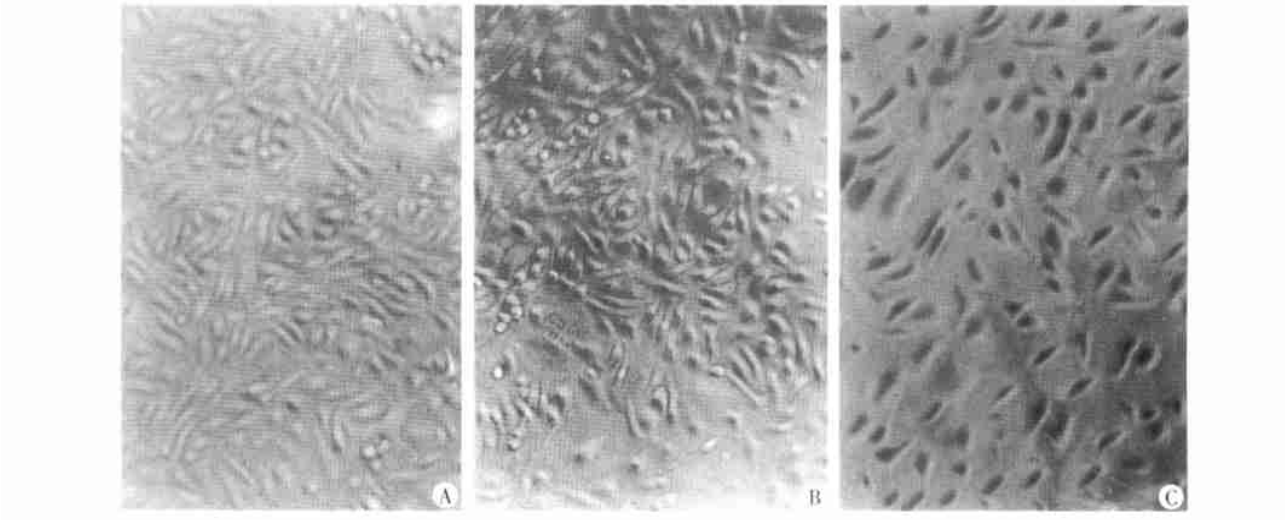
Tab 2　Changes of adhesive rate of BMSC layer after chemotherapy ($n=5$, $\bar{x}\pm s$)

Group	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d
Control	80.1±1.7	80.1±2.2	80.4±1.6	80.1±1.6	79.2±2.0
Low-dose	79.9±1.9	78.7±1.9	78.1±1.8	79.8±1.7	79.2±1.5
High-dose	66.1±1.5 **	57.9±2.6 **	40.0±1.9 **	55.1±1.7 **	57.8±1.8 **

**: $P<0.01$ *vs* Control

2.4　BMSC 层上造血细胞混合集落生长情况

对照组不同时间所进行的 BMSC 层上造血细胞混合集落培养情况相似, 集落大而密集; 小剂量组不同化疗时间后 BMSC 层上造血细胞混合集落也较大而密集, 与对照组无明显差别; 大剂量组化疗后第 7 天 BMSC 层上造血细胞混合集落较小而松散, 化疗后第 14、21、28、35 天造血细胞混合集落小而稀疏, 尤以化疗后第 21 d 集落生长最差, 见图 2。

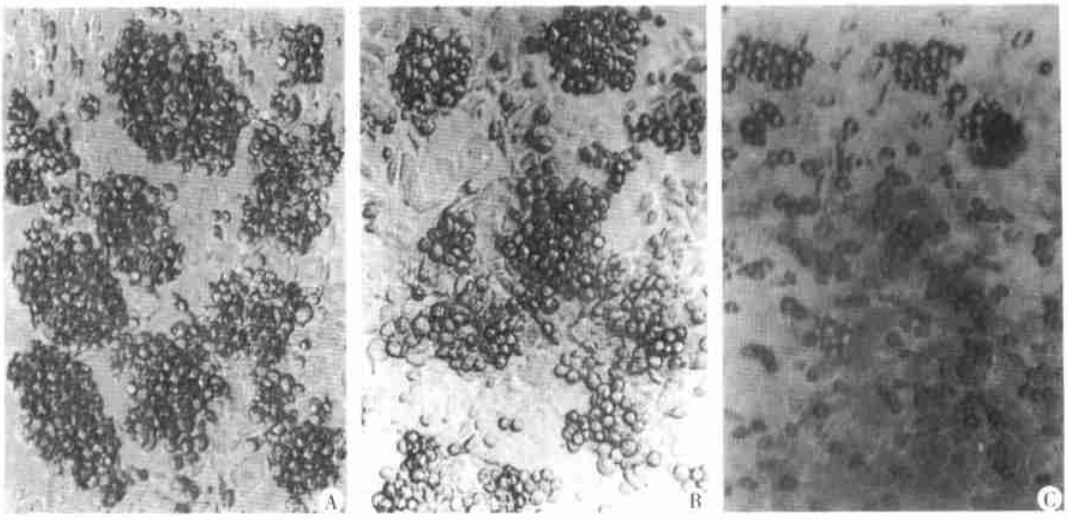


A, B, C control, low dose, high dose group respectively

图 1　各组 BMSC 形态 (光镜×100)

Fig 1　Morphology of BMSC in different group (LM×100)

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



A, B, C control, low dose, high dose group respectively

图 2 各组 BMSC 层上造血细胞混合集落形态 (光镜× 100)

Fig 2 Morphology of colony forming unit-mixed hematopoietic cells on the BMSC layer in different group (IM× 100)

3 讨论

Dexter 骨髓长期培养体系是一个被公认的能够模拟体内造血状态的体外造血模型, 其特点是培养中的粘附基质细胞层能够模仿造血微环境的多种功能特性, 不需添加任何外源性生长因子就能支持长期造血[3]。本实验采用 Dexter 型骨髓长期培养体系, 故体外培养的 BMSC 能够近似反映体内 BMSC 的功能。

BMSC 是造血微环境的重要组成部分, 主要由成纤维细胞、内皮细胞、巨噬细胞等组成, 通过与造血细胞的紧密接触及其分泌的细胞外基质和多种细胞因子, 对机体造血调控具有重要作用[2]。根据化疗剂量强度与疗效的相关性理论, 大剂量化疗可以大幅度提高化疗药物对肿瘤细胞的杀伤作用, 从而达到根治某些肿瘤的目的, 但由于多数化疗药物具有骨髓限制性毒性作用, 因此限制了剂量强度的进一步提高进而影响疗效。近年开展的造血干/祖细胞移植和造血细胞因子支持治疗可明显缩短大剂量化疗后骨髓抑制期, 但不能完全恢复自主造血功能[1]。提示大剂量化疗不但对造血细胞造成损伤, 而且可能同时损伤到与造血调控密切相关的 BMSC。

已有研究发现大剂量放/化疗后 CFU-F 形成率较正常对照组减少 60%~90%[5], 而另一项研究证实化疗后 BMSC 层支持正常异基因造血祖细胞生长的能力受到损伤: 17 例 AML 患者中有 7 例不能支持造血祖细胞生长, 7 例支持能力明显减低[6], 均提示大剂量化疗可造成 BMSC 的损伤, 但损伤的具体机制尚不清楚。我们通过临床上广泛使用的化疗药物 MTX 对小鼠体内 BMSC 影响的研究结果发现: 常规剂量(即本实验中的小剂量)MTX 对 BMSC 无明显作用, 而大剂量 MTX 化疗后第 7 天开始出现 BMSC 层粘附率显著下降, 第 14 天后出现 BMSC 生长减慢、CFU-F 形成能力和造血支持功能降低, 第 35 天仍不能恢复至正常水平。提示大剂量化疗可直接导致 BMSC 形态学改变、生长受抑以及粘附功能和造血支持能力的损伤, 使其对造血细胞的粘附作用减弱、分泌的细胞外基质和造血细胞因子减少, 从而导致 BMSC 造血调控功能障碍, 进一步影响造血细胞的存活、定居、增殖、分化、发育和成熟, 再加上大剂量化疗对造血细胞的损伤[7], 结果导致机体自主造血功能长期不能恢复。

我们在研究中还发现大剂量 MTX 所导致的 BMSC 损伤以粘附功能的下降为主, 在化疗后第 21 天最明显, 出现时间较晚, 持续时间较长。BMSC 粘附功能的降低可能有两方面的作用: ①BMSC 生长受到抑制, 所形成粘附层的 BMSC 数目较少, 间接影响其粘附功能; ②药物直接影响 BMSC 粘附分子的表达或 ECM 的分泌, 从而直接影响 BMSC 的粘附功能。在本实验中这两方面的作用可能都存在, 但何种作用占主导方面值得进一步探讨。而在 γ 射线所致的 BMSC 损伤研究中, 以伤后 3~7 d 粘附功能损伤最明显, 持续时间相对较短[8]。提示 BMSC 损伤的时效特点在大剂量化疗与放射线损伤中略有不同。

BMSC 损伤可能是大剂量化疗后造血功能发生障碍的重要原因之一, 如何防治或改善大剂量化疗后 BMSC 的损伤值得进一步研究。

参考文献:

[1] Domenech J, Roingeard F, Binet C. The mechanisms involved in the impairment of hematopoiesis after autologous bone marrow transplantation[J]. Leuk Lymphoma, 1997, 24(3-4): 239-256.

[2] Deans R J, Moseley A B. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses[J]. Exp Hematol, 2000, 28(8): 875-884.

[3] Dexter T M, Allen T G, Lajtha L G. Conditions controlling the proliferation of hematopoietic stem cells *in vitro*[J]. J Cell Physiol, 1977, 91(3): 335-344.

[4] 郑德先, 吴克复, 褚建新. 现代实验血液学研究方法与技术[M].

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

北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1999. 24-35.
[5] Galotto M, Berisso G, Delfino L, *et al*. Stromal damage as consequence of high-dose chemo/radiotherapy in bone marrow transplant recipients[J]. Exp Hematol, 1999, 27(9): 1 460-1 466.
[6] Carlo S C, Tabilio A, Regazzi E, *et al*. Effect of chemotherapy for acute myelogenous leukemia on hematopoietic and fibroblast marrow progenitors [J]. Bone Marrow Transplant, 1997, 20(6): 465-471.
[7] Del Canizo C, Lopez N, Caballeo D, *et al*. Hematopoietic damage persists 1 year after autologous peripheral blood stem cell transplantation[J]. Bone Marrow transplant, 1999, 23(9): 901-905.
[8] 陈幸华, 罗成基, 郭朝华, 等. 放烧复合伤骨髓基质细胞某些粘附分子表达的意义[J]. 第三军医大学学报, 1998, 20(2): 96-99.

(编辑 张 宁)

文章编号:1000-5404(2002)11-1279-01

个案与短篇

糖尿病合并下肢血管病变的患者治疗前后红外热像图变化

Changes of infra-red thermography in diabetic patient with lower limb ischemia before and after treatment

郑宏庭, 张学亮, 陈 卫 (第三军医大学附属新桥医院内分泌科, 重庆 400037)

红外热像图是靠从人体表面的红外辐射转变成一种图像的技术, 肢体由于血流量大小的差异, 局部温度及红外线辐射量不同, 因而红外热像技术能具体、形象、动态地反映肢体血循环状况, 作为对肢体血循环变化规律做进一步探讨的手段[1]。本研究探讨红外热像技术在糖尿病患者下肢血管病变方面的临床应用。

1 对象与方法

对象:我们在眼底检查中对单纯型糖尿病性视网膜改变的患者 10 例, 作为合并轻度糖尿病血管病变的患者;选择眼底检查发现增殖型糖尿病性视网膜改变的患者 10 例作为合并重度糖尿病血管病变的患者;选择眼底检查发现单纯或增殖型糖尿病视网膜改变, 并且神经电生理检查下肢神经传导速度减慢的患者 20 例作为糖尿病多并发症患者;选择无并发症的糖尿病患者 20 例作为对照。以上病例总数 60 例, 男 34 例, 女 26 例, 年龄 24~72 岁, 平均年龄 49.6 岁。病程 6 月至 16 年, 平均 6.7 年。其中 1 型糖尿病 10 例, 2 型糖尿病 50 例。糖尿病诊断根据 1999 年 WHO 专家咨询报告标准确定。糖尿病视网膜病变, 按 1985 年哈尔滨会议标准分型。下肢胫总和腓总神经感觉和运动传导速度小于 40 m/min, 或者有袜套样感觉障碍者为糖尿病周围神经病变者。

方法:我们对所有患者进行双下肢红外线热像检查, 将出现异常冷区(与正常对照值温度大于 0.1 摄氏度)的结果作为阳性结果, 并对数据进行 χ^2 检验和 t 检验。然后对所有血管神经并发症患者进行"维生素 B_1, 弥可保, 氢化麦角碱"及血糖控制等治疗 1 个月, 作为治疗组, 例数 40 例;对无并发症的患者单纯予以降糖治疗作为对照组, 例数 20 例, 治疗结果用红外热像仪进行评价。本研究采用 DH-2000 医用红外热像仪, 针对本研究需要曾进行了系统的温度标定工作, 在使用的温度范围段测量值与标定曲线计算的温度值之差不超过 0.3, 温度分辨率小于 0.1。

2 结果

患者热像检查结果各组间无显著性差异($P>0.05$), 由此可以看出对于糖尿病患者肢体血管病变, 热像仪为一种可靠的检查手段, 患者肢体血管病变在其图像中显示为异常冷区, 多为对称性分布。

患者治疗前后肢体温度变化见表 1, 治疗前治疗组与对照组肢体温差较大, 经治疗后温度差明显减小, 可见微循环明显改善, 故红外热像图也可作为糖尿病患者肢体血管病变治疗效果观察依据。

表 1 治疗前后肢体温度变化

组别	治疗组	对照组	温差
n	40	20	
治疗前	23.8±2.24	34.3±2.47	0.84±0.42
治疗后	34.5±1.87	34.6±2.34	0.27±0.26
t 值	3.24	2.74	6.13
P 值	<0.005	<0.005	<0.001

3 讨论

红外热像技术是应用现代物理科学技术反映物体表面各部位温度变化的一项技术, 具有无创伤, 精确度高(可达 0.01 度), 反应灵敏, 及操作简便等优点[2,3]。通过以上研究我们发现红外热像仪用于糖尿病血管病变的研究具有以下特点:① 根据异常冷区初步了解患肢病情;② 通过了解病变肢体的循环情况, 从而了解病变程度, 推断预后;③ 评价治疗的疗效;④ 了解病变部位间的差异。综上, 我们认为红外热像技术对于糖尿病肢体血管病变的诊断及治疗评价是一种可靠, 迅速的方法, 在临床上有较为广阔的应用前景。

关键词:红外热像图;糖尿病;血管病变
中图法分类号:R445.7 文献标识码:B

参考文献:

[1] 李树堂. 红外热像仪临床应用价值初探[J]. 实用医技杂志, 1996, 3(3): 186-187.
[2] 杨文涛, 张 萌, 马学强, 等. 红外热像技术对中西医结合治疗大鼠肢体缺血模型疗效的观察[J]. 山东中医药大学学报, 2000, 24(3): 232-234.
[3] Von Bierbrauer A, Schilk I, Lucke C, *et al*. Infrared thermography in the diagnosis of Raynaud's phenomenon in vibration-induced white finger[J]. Vase, 1998, 27(2): 94.

(编辑 陈聪连)

作者简介:郑宏庭(1974-),男,浙江省平阳县人,硕士研究生,医师,主要从事糖尿病及并发症方面的研究。电话:(023)68755709
收稿日期:2001-07-10;回修日期:2001-12-07

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