DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.11.021
第24卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 11
2002年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2002 

文章编号:1000-5404(2002)11-1299-03

论著

# rhGM-CSF对胎儿口腔粘膜成纤维细胞增殖及DNA合成的影响

钟大平,张翼军 (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rhGM-CSF促进口腔溃疡愈合的作用机制。方法 取体外培养的胎儿口腔粘膜成纤维细胞,用rhGM-CSF刺激成纤维细胞后第2、4、6天用细胞计数及$^3$H-胸腺嘧啶掺入法($^3$H-TdR)测定其增殖情况。结果 rhGM-CSF对胎儿口腔粘膜成纤维细胞增殖及DNA合成有刺激作用,在80~100 ng/ml时,细胞生长达到最佳状态,过高浓度rhGM-CSF的刺激作用反而下降。结论 rhGM-CSF可以通过刺激成纤维细胞增殖及DNA合成促进口腔溃疡愈合。

关键词:成纤维细胞;rhGM-CSF;$^3$H-TdR掺入;DNA合成
中图法分类号:R322.41;R329.28;R392.12 文献标识码:A

# Effect of rhGM-CSF on proliferation and DNA synthesis of fibroblasts of fetal oral mucosa

ZHONG Da-ping, ZHANG Yi-jun (Department of Oncology and Hemotology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

**Abstract:** Objective To explore the mechanism by which rhGM-CSF promoted the recovery of oral mucosa ulcers. Methods The cultured normal fibroblasts of fetal oral mucosa were studied *in vitro*. The effects of different concentrations of rhGM-CSF on proliferation and DNA synthesis of fibroblasts were observed by cell number counting and the method of $^3$H-TdR incorporation on the 2nd, 4th, 6th days. Results The proliferation and DNA synthesis of fibroblasts of fetal oral mucosa was stimulated by different concentrations of rhGM-CSF. The optimal concentration of rhGM-CSF was 80~100 ng/ml at which the proliferation of the fibroblasts achieved the best state. When the concentration was higher than 100 ng/ml, the stimulating effect declined gradually. Conclusion rhGM-CSF can promote the recovery of oral mucosa ulcers by stimulating the proliferation and DNA synthesis of fibroblasts.

**Key words:** fibroblast; rhGM-CSF; $^3$H-TdR incorporation; DNA synthesis

重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(Recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor,rhGM-CSF)是一种具有谱系特异性的细胞因子,含有127个氨基酸的多肽分子。可以刺激髓系造血祖细胞的增殖与分化,并增强成熟中性粒细胞及单核细胞的功能。近几年国外有文献报道rhGM-CSF对创面、溃疡愈合有显著疗效,我们在临床及动物实验中也证明其对化疗致口腔粘膜溃疡有显著疗效[1,2]。由于成纤维细胞在溃疡愈合中起着重要作用,本实验通过$^3$H-TdR掺入法研究rhGM-CSF对成纤维细胞增殖及DNA合成的影响,探讨其促进口腔溃疡愈合的机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂

新生牛血清购自郑州佰安生物有限公司;0.25%胰蛋白酶购自Gibco公司;rhGM-CSF由Schering Plough公司赞助;$^3$H-TdR购于北京中国原子能研究所;LKB-1 217液体闪烁计数器由芬兰生产;RPMI1640培养基、青霉素G(100 mg/ml)、链霉素(100 mg/ml)。

### 1.2 成纤维细胞原代培养

取引产胎儿的口腔粘膜组织,剪切成1 mm×1 mm×1 mm小块,用含1 000 U/ml青霉素G、链霉素的生理盐水漂洗3次,每次15 min,组织块法培养于含15%新生牛血清、100 U/ml青霉素G和链霉素的RPMI1640中,培养条件为37℃、5% $CO_2$、饱和湿度,每3 d换液1次,约4~6 d长出成纤维细胞,3~4周左右长满瓶底,然后用0.25%胰蛋白酶消化传代,取3~8代细胞用于实验。

### 1.3 成纤维细胞计数

取3~8代的对数生长期的成纤维细胞,0.25%胰蛋白酶消化,1 500 r/min离心10 min,用含15%新生牛血清的RPMI1640配制成浓度为$8\times10^4$/ml的细胞悬液,先用胎盼蓝染色测定细胞活力,活细胞率达95%以上后接种于24孔培养板50 μl($4\times10^3$)/孔,置于37℃、5% $CO_2$、饱和湿度的孵箱中培养12 h,待细胞贴壁后吸出原培养液,加入含不同rhGM-CSF或血清的RPMI1640培养液,设置rhGM-CSF 0、10、50、80、100、150 ng/ml以及1%血清、1%血清+rhGM-CSF 50 ng/ml浓度组,继续培养6 d,每隔2 d换液并加入与前面相同浓度的细胞因子及血清,每实验点复种3孔,于第2、4、6天进行细胞计数,取均值绘制生长曲线。

### 1.4 $^3$H-TdR掺入实验

按上述方法进行细胞接种培养12 h,待细胞贴壁后吸出原培养液,加入含不同浓度rhGM-CSF的RPMI1640,rhGM-CSF设置0、10、50、80、100、150 ng/ml浓度组,继续培养,每隔2 d换液并加入与前面相同浓度的细胞因子,每实验点复种3孔,于第2、4、6 d进行细胞闪烁计数。在培养结束前6 h加入$^3$H-TdR 50 μl(370 kBq)/孔,培养6 h后吸出培养液,0.25%胰蛋白酶消化细胞,用ZT-O型多孔细胞样品收集器收集细胞于999型纤维膜上,红外线烤干加闪烁液,在LKB1217液体闪烁计数器上计数。

### 1.5 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示,以双因素等重复方差分析判定差异显著性,数据统计采用统计程序包SPMR在微机上完成。

## 2 结果

### 2.1 成纤维细胞计数

从表1细胞计数结果可以看出,不同浓度rhGM-CSF对成

作者简介:钟大平(1969—),女,重庆市梁平县人,硕士,主治医师,讲师,主要从事白血病的诊治及其发病机制方面的研究。电话:(23)68754129
收稿日期:2002-05-21;修回日期:2002-09-20

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

纤维细胞的增殖有不同程度的刺激作用。经双因素等重复方差分析，发现成纤维细胞增殖与 rhGM-CSF 浓度有关系。当 rhGM-CSF 浓度为 100 ng/ml 时，与 rhGM-CSF 0、10、50 ng/ml 浓度组相差显著（$P<0.05$），而与 rhGM-CSF 80、150 ng/ml 无显著差异（$P>0.05$）；1% 血清＋rhGM-CSF50 ng/ml 组与其它各组相差非常显著（$P<0.01$）。

表 1 不同浓度 rhGM-CSF 对成纤维细胞增殖的影响（$\times 10^3$/well，$\bar{x}\pm s$）

Tab 1 Effect of different concentrations of rhGM-CSF on proliferation of fibroblasts（$\times 10^3$/well，$\bar{x}\pm s$）

| Time of culture (day) | GM-CSF(ng/ml) | | | | | | 1% serum | 1% serum＋rhGM-CSF50 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 10 | 50 | 80 | 100 | 150 | | |
| 2 | 3.0±0.2 | 4.2±0.7 | 5.5±0.59 | 9.8±1.04 | 13.2±1.61# | 11.0±1.0 | 13.9±1.21 | 21.4±3.06** |
| 4 | 2.4±0.16 | 7.5±0.12 | 12.0±4.0 | 16.3±1.53 | 17.3±1.53# | 17.0±1.58 | 26.7±1.53 | 38.0±2.65** |
| 6 | 1.6±0.16 | 14.7±2.52 | 19.7±4.04 | 21.0±1.0 | 22.5±0.5# | 21.3±1.53 | 55.7±1.53 | 73.7±1.53** |

#：$P<0.05$ *vs* rhGM-CSF 0, 10, 15 ng/ml groups；**：$P<0.01$ *vs* others groups

2.2 $^3$H-TdR 掺入实验结果

从表 2 $^3$H-TdR 掺入实验结果可以看出，不同浓度 rhGM-CSF 对成纤维细胞的增殖及 DNA 合成有不同程度的刺激作用。经双因素等重复方差分析，发现成纤维细胞增殖与 rhGM-CSF 浓度有关系。当 rhGM-CSF 浓度为 80 ng/ml 时，与 rhGM-CSF 0、10 ng/ml 浓度组相差显著（$P<0.05$），而与 rhGM-CSF 100、150 ng/ml 无显著性差异（$P>0.05$）。

表 2 $^3$H-TdR 掺入法测定 rhGM-CSF 对成纤维细胞增殖及 DNA 合成的影响（$\times 10^3$/well，$\bar{x}\pm s$）

Tab 2 Effect of rhGM-CSF on proliferation and DNA synthesis of fibroblasts by $^3$H-TdR incorporation（$\times 10^3$/well，$\bar{x}\pm s$）

| Time of culture (day) | GM-CSF(ng/ml) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 10 | 50 | 80 | 100 | 150 |
| 2 | 151±51.6 | 173±84.0 | 478±126.0 | 750±210.0* | 701±230.0* | 650±142.0 |
| 4 | 137±45.0 | 483±105.0 | 703±243.0 | 1 247±513.3* | 1 203±482.9* | 1 077±356.7 |
| 6 | 128±47.0 | 695±215.0 | 1 154±546.0 | 1 452±593.5* | 1 363±473.2* | 1 293±343.9 |

*：$P<0.05$ *vs* rhGM-CSF 0, 10 ng/ml groups

## 3 讨论

化疗所致口腔粘膜溃疡处存在组织缺损和感染，愈合属二期，其愈合过程中有炎性细胞和修复细胞（成纤维细胞、内皮细胞、上皮细胞等）参与，主要包括炎症反应、细胞增殖、分化移行、血管神经再生以及细胞外基质的合成及重建等一系列过程。Mackool、Jobson 等[3, 4]认为真皮内的成纤维细胞在皮肤损伤后创面愈合的各个阶段都发挥着重要作用，其中的机制涉及成纤维细胞的增殖状态、分化与表型变化、参与基质分子代谢等方面。在某些难愈性病理损伤中，成纤维细胞增殖能力降低，其恢复与否直接影响创面能否修复及修复的程度[5]。

RhGM-CSF 受体不仅广泛表达于造血细胞、成熟的外周血细胞表面，也表达于上皮细胞、成纤维细胞、巨噬细胞和血管内皮细胞等非造血细胞表面，其广泛的生物学作用发挥有赖于与效应细胞表面的特异性受体结合[6~8]。成纤维细胞计数及 $^3$H-TdR 掺入结果表明，不同浓度 rhGM-CSF 对成纤维细胞的增殖及 DNA 合成均有刺激作用，在 80~100 ng/ml 时，细胞生长达到最佳状态，过高浓度 rhGM-CSF 的刺激作用反而下降，与文献[9]报道相似，推测可能与细胞膜上受体和配体结合是否达到饱和有关。rhGM-CSF 能刺激成纤维细胞的增殖及 DNA 合成是 rhGM-CSF 促进溃疡及创伤愈合的机制之一。在本实验中同时可见血清具有协同 rhGM-CSF 刺激成纤维细胞增殖的现象，这可能是血清中富含的运铁蛋白与胰岛素等细胞增殖必需成分作用的结果。

另有文献提到在中性粒细胞减少的动物实验中伤口愈合能正常进行，其机制可能是巨噬细胞释放巨噬细胞衍化生长因子（MDGF），以刺激成纤维细胞的有丝分裂；活化和低氧下的巨噬细胞能产生伤口血管生长因子，以促进肉芽形成。RhGM-CSF 可刺激单核巨噬细胞的增殖[10]。因此我们认为 rhGM-CSF 可能通过多种途径参与溃疡的愈合：①中性粒细胞减少使患者易出现口腔感染，加重口腔粘膜炎，而 rhGM-CSF 可加速中性粒细胞的恢复，可控制口腔粘膜炎的发展；②rhGM-CSF 可能直接刺激口腔粘膜细胞（上皮细胞、成纤维细胞、血管内皮细胞等）的生长或再生，促进溃疡愈合。③rhGM-CSF 可刺激单核巨噬细胞的增殖，巨噬细胞释放巨噬细胞衍化生长因子（MDGF），以刺激成纤维细胞的有丝分裂；活化和低氧下的巨噬细胞能产生伤口血管生长因子，以促进肉芽形成。

参考文献：


[1] Bez C, Demarosi F, Sardella A, *et al*. GM-CSF mouthrinses in the treatment of severe oral mucositis: a pilot study[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 1999, 88(3): 311-315.

[2] Rovirosa A, Ferre J, Biete A. Granulocyte macrophage colony stimulating factor mouthwashes heal oral ulcers during head and neck radiotherapy[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1998, 41(4): 747-754.

[3] Mackool R J, Gittes G K, Longaker M T. Scarless healing: The fetal wound[J]. Clin Plast Surg, 1998, 25(3): 357-365.

[4] Jobson T M, Billington C K, Hall I P. Regulation of proliferation of human colonic subepithelial myofibroblasts by mediators important in intestinal inflammation[J]. J Clin Invest, 1998, 101(12): 2 650-2 657.

[5] Stanley A C, Park H Y, Phillips T J, *et al*. Reduced growth of dermal fibroblasts from chronic venous ulcers can be stimulated with growth factors[J]. J Vasc Surg, 1997, 26(6): 994-999.

[6] Zhao Y, Chegini N. The expression of granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) and receptors in human endometrium[J]. Am J Reprod Immunol, 1999, 42(5): 303-311.

[7] McCormack M P, Gonda T J. Novel murine myeloid cell lines that exhibit a differentiation switch in response to IL-3 or GM-CSF, or to different consti-


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

tutively active mutants of the GM-CSF receptor beta subunit[J]. Blood, 2000, 95(1): 120—127.
[8] McCormack M P, Gonda T J. Myeloproliferative disorder and leukaemia in mice induced by different classes of constitutive mutants of the human IL-3/IL-5/GM-CSF receptor common beta subunit[J]. Oncogene, 1999, 18(51): 7 190—7 199.
[9] Postiglione L, Montagnani S, Riccio A, *et al*. Expression of GM-CSF receptor and "in vitro" effects of GM-CSF on human fibroblasts[J]. Life Sci, 1998, 63(5): 327—336.
[10] 刘 恭. 现代医学免疫学[M]. 南京:江苏科学技术出版社, 2000.2.

(编辑 张 宁)

文章编号:1000-5404(2002)11-1301-01

# 个案与短篇

## 新生儿肝脏巨大混合性血管瘤并卡—麦二氏综合征 1 例

## A case report of large and heterogeneous hemangioma of the liver with Kasabach-Merritt syndrome in a neonate

于若谷, 赵聪敏, 叶明福 (第三军医大学附属新桥医院儿科, 重庆 400037)

患儿, 女性, 因生后皮肤青紫 20 h 入院。入院查体: T 37 ℃, P 136 次/min, R 54 次/min, WT 2.81 kg。足月新生儿貌, 皮肤巩膜中度黄染, 皮肤出血点及淤斑, 以腹部、背部、双下肢较多, 头颅左侧可扪及 8 cm× 8 cm 大小软性包块, 有波动感, 不过骨缝, 前囟 1.5 cm× 1.5 cm, 平软, 右眼裂小, 唇周发青, 双肺呼吸音粗, 未闻及罗音, 心音有力, 心律齐, 未闻及明显杂音, 腹软, 肝肋缘下 6.5 cm, 质中。脾肋缘下刚触及。脊柱、肛门、外生殖器无畸形, 右第四趾内收畸形。

辅助检查: 血常规: WBC 19.5× $10^9$/L, RBC 3.91× $10^{12}$/L, HGB 136 g/L, PLT 50× $10^9$/L, N 0.5, L 0.5, 网织红 0.02。肝功: ALT 22.00 U/L, AST 214.00 U/L, AST/ALT 9.73, TP 56.00 g/L, ALB 36.00 g/L, GLB 20.00 g/L, A/G 1.8, T-BIL 251.26 μmol/L, D-BIL 9.77 μmol/L, ALP 95.00 U/L, GGT 281.00 U/L。TORCH: 弓形体、风疹、巨细胞、单疱 IgM 抗体(—)。血型: A(D), 其母 A(D)。凝血 3 项: PT 16.2 s(对照 11.7 s), APTT 与 TT 正常。肿瘤标志物: AFP 1131 μg/L, HA378 μg/L。腹部 B 超: 肝右叶不均质实性肿块(7.21 cm× 6.98 cm), 伴大量钙化灶, 血流丰富; 心脏彩超: 右房、右室增大; 房间隔缺损。

初步诊断: ① 头颅血肿; ② 先心病; ③ 肝母细胞瘤?; ④ 贫血。入院后给于 K1、蓝光、IVIG、血浆、抗感染等治疗, 病情无好转。第 2 天双下肢出现凹陷性水肿, 皮肤黄染及头颅血肿加重(10 cm× 10 cm), 肝脏增大(肋缘下约 8 cm), 质硬, 表面可触及结节, 外阴可见血性分泌物, 穿刺部位不易止血, 于入院第 4 天死亡。

解剖: 肝重 188 g, 大小 14 cm× 9.4 cm× 4.5 cm, 肝右叶有 8 cm× 7 cm× 4.5 cm 包块, 边界不清及无包膜, 表面和切面均呈暗红色伴出血与坏死。光镜观察肝脏瘤组织, 主要由大小不等的海绵状血管和毛细血管组成伴片状出血坏死。肿瘤性血管区肝组织完全缺失, 并见血管向周围肝组织内生长。有的肝门脉区见多数扩大血管腔。非肿瘤区肝组织变性、淤胆、肝窦高度扩张。心脏重 29 g, 右心房明显扩张, 房间隔有一类圆形缺损, 直径 1.4 cm。右房壁厚 0.1~0.2 cm, 右室壁厚 0.5 cm, 左室壁厚 0.5 cm, 各瓣膜无异常。光镜观察心肌, 提示细胞肿胀、扭曲或有断裂, 间质血管扩张、充血伴有灶片状出血与组织水肿。光镜观察两肺, 显示肺组织广泛充血、出血和肺实变, 肺泡腔内充满红细胞、肺泡上皮及一些炎细胞, 部分支气管腔及肺泡组织中散见成片的胎粪样物。病理诊断: 新生儿肝脏海绵状毛细血管瘤伴瘤组织大片出血、坏死; 房间隔缺损伴右心房扩张、房室壁肥厚, 心肌肿胀, 间质水肿、出血; 肺氧水吸入伴吸入性肺炎及广泛性肺充血、出血; 头皮血肿; 多脏器淤血与出血; 皮肤、巩膜黄染。死亡原因: 呼吸、循环与肝衰竭。

### 讨论

肝脏海绵状血管瘤、毛细血管瘤及血管内皮瘤均系来自中胚叶的良性肿瘤, 巨大而呈混合性较为少见[1]。因血管瘤内滞留并消耗大量血小板、凝血因子和纤维蛋白原而导致贫血和凝血机制异常, 即卡—麦二氏(Kasabach-Metritt)综合征, 在临床更为罕见[2]。本例虽未伴随体表血管瘤, 然而右眼裂较小, 右第四趾内收畸形, 均支持肝血管瘤或可能畸形的诊断。心脏畸形、肝脏迅速增大与腹部 B 超提示肝右叶大量钙化和血流丰富, 血小板减少、出血倾向、凝血机制不佳均为本病诊断的佐证而最终致死。在治疗方面, 文献报道包括抗凝; 环磷酰胺; 类固醇; α-2A 干扰素; 放疗; 肝叶切除; 肝动脉结扎; 肝动脉栓塞等[1,3]。我们考虑本例可采用支持与抗凝基础上的肝区放疗也许有助于治疗和抢救的成功。

关键词: 新生儿; 肝脏; 血管瘤
中图法分类号: R732.2; R745.7 文献标识码: B

### 参考文献:

[1] Lyer C P, Stanley P, Mahour G H. Hepatic hemangiomas in infants and children: a review of 30 cases[J]. Am Surg, 1996, 62(5): 356—360.
[2] Akiyoshi K, Mizote H, Tanaka Y, *et al*. Capillary hemangioma of the liver with Kasabach-Merritt syndrome in a neonate: report of a case[J]. Surg Today, 2000, 30(1): 86—88.
[3] Hurvitz S A, Hurvitz C H, Sloninsky L, *et al*. Successful treatment with cyclophosphamide of life-threatening diffuse hemangiomatosis involving the liver[J]. J Pediatr Hematol Oncol, 2000, 22(6): 527—532.

(编辑 薛国文)

作者简介: 于若谷(1974—), 女, 重庆市人, 医师, 主要从事小儿脑损伤早期干预方面的研究。电话: (023)68755602
收稿日期: 2001-12-12; 修回日期: 2002-03-13

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