DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.11.010
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)11-1273-03

论著

高浓度甲氨喋呤致培养小鼠骨髓基质细胞损伤的初步探讨

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

提 要:目的 探讨不同浓度甲氨喋呤(MTX)对培养小鼠骨髓基质细胞(BMSC)的影响、作用机制及其量效关系。方法 培养的BMSC中加入不同浓度MTX(对照组:0 μmol/L;浓度Ⅰ组:0.01 μmol/L;浓度Ⅱ组:0.1 μmol/L;浓度Ⅲ组:1.0 μmol/L),对BMSC形态学及生长情况、成纤维细胞集落(CFU-F)数目、BMSC层粘附率和造血细胞混合集落生长情况等进行观察比较。结果 浓度Ⅰ组上述指标与对照组无明显差别;而浓度组Ⅱ和浓度Ⅲ组梭形成纤维细胞较对照组明显减少,生长曲线低平($P<0.05$, $P<0.01$),CFU-F计数或粘附率均较正常组显著减少或降低($P<0.01$),造血细胞集落生长差,以浓度Ⅲ组改变最明显。结论 高浓度MTX可导致离体小鼠BMSC形态学改变、生长受抑以及粘附功能和造血支持功能的损伤,其损伤作用在一定范围内呈浓度依赖性。

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

Damage to murine bone marrow stromal cells induced by MTX at *in vitro* high concentration

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

Abstract: **Objective** To explore the effects of different concentrations of Methotrexate (MTX) on murine bone marrow stromal cells (BMSC) *in vitro*. **Methods** Cultured BMSCs were added with MTX of 0 μmol/L (control group), 0.01 μmol/L (group Ⅰ), 0.1 μmol/L (group Ⅱ), 1.0 μmol/L (group Ⅲ) respectively, then the morphology and growth of BMSC were observed, the number of colony forming unit-fibroblast (CFU-F) counted, the adhesive function of BMSC assayed and the growth of colony forming unit-mixed hematopoietic cells (CFU-Mix) on the BMSC layer observed. **Results** No remarkable difference was found between the above indexes of concentration Ⅰ group and those of the control. In concentration Ⅱ and Ⅲ groups, however, the number of fibroblast decreased significantly, the growth curve of BMSC lowered, the number of CFU-F and the adhesive function reduced significantly and the growth of CFU-Mix slowed down. The most remarkable changes were found in concentration Ⅲ group. **Conclusion** The morphology of BMSC can be changed, the growth of BMSC can be inhibited, and the ability of BMSC to adhere and support hematopoiesis can be damaged by high concentration of MTX. To a certain extent, the damage to BMSC by MTX is dependent upon its concentration.

Key words: bone marrow; stromal cells; MTX; *in vitro*

化疗剂量强度与疗效的相关性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,但大剂量化疗可导致患者造血功能长期不能恢复[1]。骨髓基质细胞(Bone marrow stromal cells, BMSC)是造血微环境的重要组成部分,在调控造血细胞的存活、定居、增殖、分化、发育和成熟过程中具有重要作用[2],大剂量化疗不但造成造血细胞的损伤,同时也可能损伤到调控机体造血的BMSC。本研究就临床上广泛使用的化疗药物甲氨喋呤(Methotrexate, MTX)进行离体实验,探讨不同浓度MTX对BMSC的影响,并分析其作用机制及特点,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,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、D-Hanks液、胎牛血清(Hyclone),马血清(郑州佰安),Percoll分离液(Pharmacia),胰酶(华美),甲氨喋呤(浙江万马,批号:000705)。

1.3 骨髓单个核细胞(BMMNC)制备

颈椎脱臼处死小鼠,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。

1.4 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。

1.5 实验分组

按MTX终浓度分为4组,对照组:0 μmol/L;浓度Ⅰ组:0.01 μmol/L;浓度Ⅱ组:0.1 μmol/L;浓度Ⅲ组:1.0 μmol/L。

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天换液时分别加入不同浓度MTX,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1ml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,不同浓度MTX在培养第10天换液时分别加入各组培养孔中;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。

1.8 BMSC生长曲线[5]

第4周BMSC以0.25%胰酶消化,调整细胞浓度为5×10^4/ml,1 ml/孔接种于24孔培养板中,分别于传代培养后1周内每天进行活细胞计数,每次每组各计数3孔取均值,绘制细胞生长曲线。

1.9 BMSC层粘附率测定

第4周BMSC层以PBS液冲洗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

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

收稿日期:2002-05-02;修回日期:2002-08-27

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

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：

$$\text{BMSC 层粘附率} = (1 - \frac{\text{未粘附细胞数目}}{4\times 10^5}) \times 100\%$$

1.10 BMSC 层上造血细胞混合集落培养

第 4 周 BMSC 层用 $^{60}Co\gamma$ 射线照射 15 Gy，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。

1.11 统计学分析

采用 t 检验。

2 结果

2.1 CFU-F 计数

浓度Ⅰ组与对照组比较无显著差异（$P>0.05$）；浓度Ⅱ组和浓度Ⅲ组 CFU-F 计数均较对照组显著减少（$P<0.01$），而浓度Ⅲ组 CFU-F 计数显著低于浓度Ⅱ组（$P<0.01$），见表 1。

2.2 BMSC 形态及生长曲线

对照组 BMMNC 在培养 3～4 周后融合成以梭形细胞为主 BMSC 单层；浓度Ⅰ组 BMSC 生长也较为迅速，梭形成纤维细胞较多，培养 4 周基本能融合；浓度Ⅱ组和浓度Ⅲ组 BMSC 生长较慢，梭形成纤维细胞较少，而以圆形、不规则形细胞为主，培养 28 d 融合较差。

培养 4 周的各组 BMSC 生长曲线见图 1（浓度Ⅰ组曲线未予标出，因与对照组曲线基本重叠）。对照组细胞生长曲线呈典型的 S 形，接种后第 3～5 天为指数生长期，细胞倍增时间约为 2 d；浓度Ⅱ组和浓度Ⅲ组 BMSC 生长变慢，生长曲线较低平，细胞倍增时间约为 3～4 d，与对照组比较差异显著或非常显著（$P<0.05$ 或 $P<0.01$），而浓度Ⅲ组 BMSC 数目较浓度Ⅱ组显著减少（$P<0.01$）。

2.3 BMSC 层对正常 BMMNC 的粘附能力

结果见表 1。浓度Ⅰ组与对照组比较无显著差异（$P>0.05$）；浓度Ⅱ组和浓度Ⅲ组粘附力均较对照组显著下降（$P<0.01$），而浓度Ⅲ组与浓度Ⅱ组比较，差异非常显著（$P<0.01$）。

表 1 不同浓度 MTX 对 CFU-F 计数和 BMSC 层粘附率的影响（$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

Tab 1 Effects of different concentrations of MTX on CFU-F and adhesive rate of BMSC layer（$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

Group	No. of CFU-F/ 4×10^5 BMMNC	Adhesive rate of BMSC layer (%)
Control	20.2±3.5	80.5±2.9
Ⅰ	19.5±2.7	80.0±3.2
Ⅱ	13.8±2.8**	59.8±3.3**
Ⅲ	6.7±2.2**△△	20.7±4.1**△△

**：$P<0.01$ vs Control；△△：$P<0.01$ vs Concen group Ⅱ

2.4 BMSC 层上造血细胞混合集落生长情况

对照组 BMSC 层上造血细胞混合集落大而密集，浓度Ⅰ组与正常组无明显差别，浓度Ⅱ组和Ⅲ组造血细胞混合集落生长差，呈凋零状，集落小而散，浓度Ⅲ组集落生长最差，见图 2。

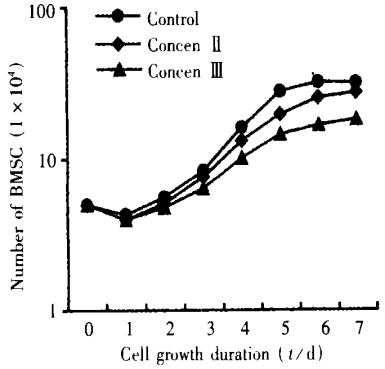
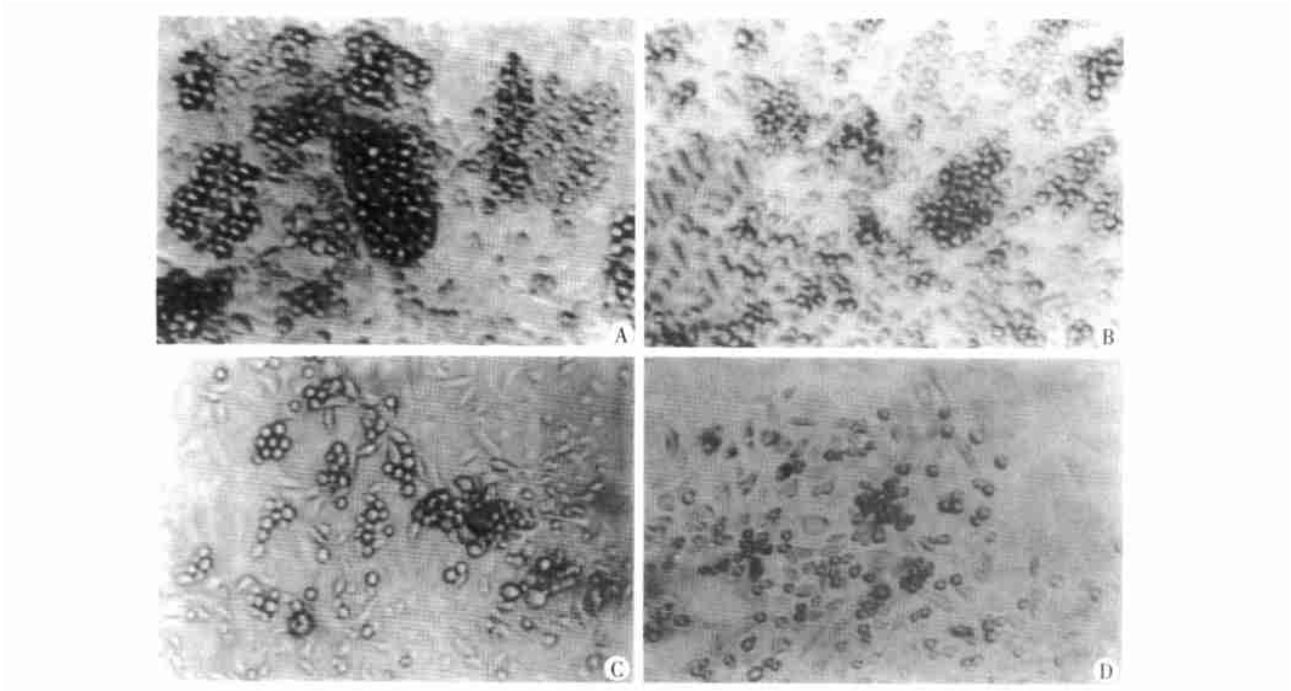


图 1 不同浓度 MTX 对 BMSC 生长的影响

Fig 1 Effects of different concentrations of MTX on the growth of BMSC



A, B, C, D control and group Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ respectively

图 2 各组 BMSC 层上造血细胞混合集落形态 （×100）

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

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

3　讨论

Dexter 骨髓长期培养体系的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, 是一个被公认的能够模拟体内造血状态的体外造血模型[3]。故本实验体外培养的 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, 对机体造血调控具有重要作用[2]。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而达到根治某些肿瘤的目的, 但其骨髓抑制性毒性作用却限制了剂量强度的进一步提高。近年开展的造血干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。

Hall 及其同事在系列研究[6, 7]中发现: BMSC 在 100 μmol/L 浓度 VP-16 作用下, 核转录因子发生量的改变(p65∶p50 的比率下降)且与 DNA 结合的能力 6 h 后降低 50%, 同时 VCAM-1 mRNA 的水平在作用 4 h 后减低 65%且随作用时间延长而递减, 而 VCAM-1 mRNA 半衰期并未发生改变。提示 BMSC 在化疗药物作用下可通过核转录因子的变化而使表面粘附分子表达减少, 从而失去造血支持功能, 但大剂量化疗导致 BMSC 损伤的机制可能不仅限于粘附分子的改变。我们通过临床上广泛使用的化疗药物 MTX 对体外培养 BMSC 影响的研究结果发现: 较高浓度 MTX 可直接抑制 BMSC 的生长, 使其形态学、细胞组成发生改变, 并明显损伤 BMSC 的粘附功能和造血支持功能, 这种损伤作用在一定范围内具有浓度依赖性的特点。提示高浓度 MTX 可直接诱导 BMSC 损伤, 使其粘附造血细胞的功能受损、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, 结果影响自主造血功能的重建。

我们在实验中还观察到 BMSC 在离体条件下比在动物实验中受到 MTX 的损伤作用更大(待发表资料), 这可能与 BMSC 所处细胞周期不同有关。BMSC 在体内相对处于静止期, G_0 期细胞比例较大, 而在离体培养条件下, BMSC 处在 S 期的比例较大[8]。由于 MTX 属于 S 期特异性抗肿瘤药, 所以把 MTX 直接加入体外培养的 BMSC 中对其抑制作用强于把 MTX 注入动物体内对 BMSC 的作用。

BMSC 损伤可能是大剂量化疗后造血功能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]. 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] 司徒镇强, 吴军正 主编. 细胞培养[M]. 第 2 版. 西安: 世界图书出版公司西安分公司, 1996. 175—177.

[6] Hall B M, Fortney J E, Gibson L F. Alteration of nuclear factor-κB (NF-κB) expression in bone marrow stromal cells treated with etoposide[J]. Biochem Pharmacol, 2001, 61(10): 1 243—1 252.

[7] Gibson L F, Fortney J E, Landreth K S, *et al*. Disruption of bone marrow stromal cell function by etoposide[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 1997, 3(3): 122—132.

[8] Banfi A, Muraglia A, Dozin B, *et al*. Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cell: Implications for their use in cell therapy[J]. Exp Hematol, 2000, 28(6): 707—715.

(编辑　张　宁)

(上接 1272 页)

制: 2 例发生心脏毒性反应患者的血浆内皮素含量明显增高, 内皮素是极强的缩血管物质, 引起冠状动脉痉挛, 继发心肌缺血[3]; 冠状动脉内膜损伤, 继发血栓形成, 引起狭窄; 动物实验, 放射治疗后光镜发现间质纤维化增加, 化疗后电镜观察到线粒体和肌浆网破坏, 同步放化疗时还观察到了凋亡细胞, 证明放射治疗加重了心肌和血管损伤[3]; 另外, 高剂量、年龄、基础心血管疾病等因素也可增加毒性反应。有作者提出了 5-Fu 心脏毒性反应的诊断标准, 包括 3 点: 化疗期间出现的 S-T 段、Q 波改变和心律失常等心电图异常; 心肌酶谱异常; 心脏功能下降的表现。患者出现其中的 2 项, 即可诊断[4]。

该患者无心脏病史, 但接受过纵隔放射治疗, 有危险因素, 每次化疗时出现室性早搏, 化疗结束后好转, 表现为急性心脏毒性反应, 多次化疗后有加重趋势, 出现严重的恶性室性早搏, 二联律, 伴有心脏功能下降, 心脏彩超证明左室功能下降, 符合上述诊断标准。5-Fu 的心脏毒性反应以严重室性早搏为主要表现尚未见报道。其原因可能与心肌缺血有关, 治疗应予心肌营养和扩冠状血管药物, 对于采用 5-Fu 化疗的患者, 尤其有高危因素的患者, 应该注意发生心脏毒性的可能, 积极处理, 能够恢复正常。

关键词: 食管癌; 氟尿嘧啶; 室性早搏

中图法分类号: R541.702　　文献标识码: B

参考文献:

[1] Schober C, Papageorgiou E, Harstrick A, *et al*. Cardiotoxicity of 5-fluorouracil in combination with folinic acid in patients with gastrointestinal cancer[J]. Cancer, 1993, 72(7): 2 242—2 247.

[2] Porta C, Moroni M, Ferrari S, *et al*. Endothelin-1 and 5-fluorouracil-induced cardiotoxicity[J]. Neoplasma, 1998, 45(2): 81—82

[3] 崔亚利, 胡玉林, 高永君. 5-Fu 和 DDP 联合放疗对心脏损伤的观察[J]. 实用肿瘤学杂志, 2000, 14(1): 23—25

[4] 潘凌亚, 杨秀玉, 宋鸿钊, 等. 5-氟尿嘧啶对心脏损害的临床观察[J]. 中华妇产科杂志, 1996, 31(20): 86—89.

(编辑　陈聪连)

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