DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.02.003
第24卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 2
126 2002年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)02-0126-03

小鼠骨髓基质细胞对粒系祖细胞生长调控的实验研究

郭朝华[1],冉新泽[1],孔佩艳[2],张 勇[3],周燕虹[1],邹仲敏[1],粟永萍[1],高京生[1],罗成基[1] (第三军医大学:[1]预防医学系防原医学教研室、全军复合伤研究所,重庆 400038;[2]附属新桥医院血液内科,重庆 400037;[3]附属西南医院血液内科,重庆 400038)

提 要:目的 研究放射损伤小鼠骨髓基质细胞对粒系祖细胞生长的影响。方法 采用体外小鼠骨髓基质细胞贴壁培养法和粒系祖细胞(CFU-GM)培养法。结果 伤后3~7 d,有基质细胞贴壁的CFU-GM生长明显低于无贴壁组;伤后14 d贴壁层形成后,放射损伤组的CFU-GM生长明显低于正常对照组;放射损伤后3~7 d,骨髓基质细胞可抑制正常CFU-GM生长,用薄层琼脂分隔基质细胞贴壁层与靶细胞,其抑制作用减弱。当无外源性集落刺激因子(CSF)时,基质细胞贴壁层对CFU-GM生长仍显示一定刺激作用。结论 辐射使骨髓基质细胞功能受到一定损伤,但在放射损伤造血修复与重建过程中,骨髓基质细胞仍起着"刺激"与"抑制"双重的动态平衡调控作用。

关键词:放射损伤;骨髓基质细胞;粒系祖细胞
中图法分类号:R329.28;R818.74 文献标识码:A

Regulatory effects of mice bone marrow stroma cells on growth of granulocyte progenitor cells

GUO Chao-hua, RAN Xin-ze, KONG Pei-yan, ZHANG Yong, ZHOU Yan-hong, ZOU Zhong-min, SU Yong-ping, GAO Jing-sheng, LUO Cheng-ji(Research Institute of Combined Injury, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of bone marrow stroma cells from irradiated mice on the proliferation of granulocyte progenitor cells. Methods Health mice were exposed to 60 Gy of γ-irradiation every day for 3, 7 and 14 d. The bone marrow nuleated cells of them and the control mice were isolated and cultured for 14 d for stroma cells. The normal, irradiated stroma cells were then co-cultured with normal or irradiated murine bone marrow nucleated cells to evaluate the CFU—GM growth. The stimulating effects of stroma cells on the growth of granulocyte progenitor cells were determined. Results The supernatant of cultured normal stroma cells prevented CFU-GM growth. Exogenous GM-CSF addition to the culture system had no influence on granulocyte progenitor cells. CFU-GM growth was obviously inhibited in the medium with nuleated cells form the mice receiving 3- to 7-day irradiation. Agar layer in the culture medium inhibited the growth of CFU-GM. Conclusion Bone marrow stroma cells play an important role in the reconstruction of hematopoiesis in mice after being exposed to γ-irradiation.

Key words: irradiation injury; bone marrow cells; progenitor cells of granulocytes

骨髓基质细胞在机体造血微环境中起着重要作用,它不仅参与机体的造血调控,而且与造血干细胞及各系祖细胞的定居、增殖、分化、成熟乃至释放密切相关,尤其对粒系祖细胞生成的调控意义更大[1,2]。因此研究造血基质细胞调控粒系造血细胞的机制在实验血液学和临床血液学中均有重要意义。本实验观察了骨髓基质细胞对粒系祖细胞生长的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物和致伤条件

第三军医大学实验动物中心提供的昆明品系健康小鼠,体重20~24 g,雌雄不拘。致伤条件:^{60}Co γ射线辐射源,照射剂量为一次性全身照射6 Gy,距离1.5 m,剂量率40 cGy/min。

1.2 实验分组与方案

实验分放射损伤组(R)和正常对照组(Control),并设计以下方案:①为观察正常小鼠骨髓基质细胞贴壁层对CFU-GM生长的影响,采用正常小鼠骨髓基质细胞培养2周贴壁后接种放射损伤3、7 d或正常小鼠骨髓进行CFU-GM培养。②为观察辐照鼠骨髓基质细胞贴壁层对CFU-GM生长的影响,采用照后14 d的小鼠骨髓基质细胞培养2周贴壁后再接种放射损伤14 d或正常小鼠骨髓进行CFU-GM培养。③为观察琼脂分隔培养的辐照鼠骨髓基质细胞贴壁层对CFU-GM生长的影响,采用照后14 d的小鼠骨髓基质细胞培养2周贴壁后再接种放射损伤3、7 d或正常小鼠骨髓进行CFU-GM培养。其双层琼脂分隔培养方法是:吸去贴壁细胞上清液,用RPMI1640液洗2次,加入培养液(含25%马血清,0.5%琼脂)1 ml,凝固后再加入CFU-GM完全培养体系1.0 ml。R组与对照组又分为有基质细胞贴壁层培养和无基质细胞贴壁层培养,各组又分设外源性集落刺激因子(CSF)对照组(1 000 U/ml的CSF加入量为50 μl)。每组各时相点动物≥5只。所有实验均重复3次。

1.3 骨髓有核细胞的制备

分别将各时相点小鼠脱臼处死,置入75%酒精浸泡5 min,无菌条件下剥离出双侧股骨,用5 ml 1640液,7号针头冲洗全部骨髓,换4号针头过滤,制成单细胞悬液。

1.4 骨髓基质细胞贴壁培养

培养体系为RPMI1640培养液,内含100 U/ml的青霉素和100 μg/ml链霉素,10%马血清,10%小牛血清和10^{-6} mol/L氢化可的松。加入小鼠骨髓有核细胞,细胞终浓度为2×10^6/ml。充分混匀后加入到直径35 mm培养皿中,每皿2 ml;每组分别设20~30个重复皿,然后置入37 ℃、5% CO_2培养箱内孵育,每周半量换液,共培养2周后弃去培养上清液。

基金项目:全军"九五"医药卫生攻关课题(96L045)
作者简介:郭朝华(1957—),男,湖北省公安县人,实验师,主要从事辐射血液学方面的研究。电话:(023)68752278
收稿日期:2001-07-06;修回日期:2001-09-04

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

基质祖细胞(CFU-F)集落计数: 培养 2 周后终止培养, 用生理盐水洗涤、室温晾干、染色, 计数 50 个非圆形细胞组成的细胞团。

1.5　粒系祖细胞(CFU-GM)培养

培养体系为 RPMI1640 完全培养液, 内含 25% 的马血清。在培养体系中分别加入小鼠骨髓有核细胞(细胞终浓度为 1×10^5/ml), 37 ℃水浴, 置 15 min 后加入琼脂(终浓度为 0.3%), 充分混匀并分别置于弃去上清液的基质细胞层上, 置 5% CO_2 的培养箱内, 37 ℃孵育 7 d, 倒置显微镜下观察并计数, 以≥50 个细胞组成的细胞团为一个 CFU-GM 集落。

同时, 本实验在正常及损伤动物的基质细胞层上均设置了不加骨髓有核细胞的空白对照, 结果证实在本实验条件下, 基质细胞层本身不产生 CFU-GM 集落, 从而排除了骨髓基质细胞层本身产生 CFU-GM 的可能。

1.6　统计学分析

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用第四军医大学统计教研室 SPLM 软件进行分析。

2　结果

2.1　正常小鼠骨髓基质细胞贴壁层对 CFU-GM 生长的影响

伤后不同时间, 有基质细胞贴壁层的集落生长均显著低于无贴壁层者, 而无基质细胞贴壁层组, 不加 CSF 时, 无集落生长, 当有基质细胞贴壁层生长, 不加外源性 CSF 时, 基质细胞贴壁层显示出一定刺激作用, 见表 1。

表 1　正常鼠基质细胞贴壁层对 **CFU-GM** 生长的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Effects of bone marrow stroma cells from normal mice on CFU-GM in different conditioned cultures($\bar{x}\pm s$)

		CFU-GM/10^5 nucleated cells in bone marrow			
		Control		R	
		CSF	Non-CSF	CSF	Non-CSF
Non-adherent	3 d	93.28±4.56	0	7.18±0.75	0
	7 d	96.25±6.71	0	63.91±4.23 ##	0
Adherent	3 d	31.12±9.84 **	20.68±13.15	2.19±0.67 **	1.06±0.94
	7 d	35.83±10.35 **	21.79±11.28	46.25±6.81 *##	21.62±8.95

*: $P<0.05$,　**: $P<0.01$ *vs* non-adherent;
##: $P<0.01$ *vs* 3 d in the same group

2.2　辐照鼠骨髓基质细胞贴壁层对 CFU-GM 生长的影响

伤后 14 d 贴壁层形成后, 分别接种 CFU-GM 有贴壁层集落生长均显著低于无贴壁层, 而有贴壁层损伤组又低于正常组, 无基质细胞贴壁层组, 不加外源性 CSF, 无集落生长, 有基质细胞贴壁层组, 无外源性 CSF 时, 基质细胞贴壁层组, 同样显示出一定的刺激作用, 见表 2。

表 2　辐照鼠伤后 **14 d** 基质细胞贴壁层对 **CFU-GM** 生长的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Effects of stroma cells from irradiated mice 14 d after injury on the CFU-GM growth ($\bar{x}\pm s$)

	CFU-GM/10^5 nucleated cells in bone marrow			
	Control		R	
	CSF	Non-CSF	CSF	Non-CSF
Non-adherent	101.95±6.21	0	101.76±9.48	0
Adherent	49.53±4.27 **	22.48±12.12	21.35±1.52 **	16.83±3.82

**: $P<0.01$ *vs* non-adherent

2.3　琼脂分隔培养的辐照鼠骨髓基质细胞贴壁层对 CFU-GM 生长的影响

伤后 3 和 7 d, 骨髓基质细胞均表现出抑制正常鼠 CFU-GM 集落的生长, 琼脂隔开各基质细胞贴壁层与其上种植的靶细胞, 抑制作用减弱。而直接孵育, 不加外源性 CSF 时, 基质细胞贴壁层仍具有一定的刺激作用, 当用琼脂隔开各基质细胞贴壁层与其上种植的靶细胞, 刺激作用明显减弱, 见表 3。

表 3　琼脂分隔培养的辐照鼠基质细胞贴壁层对 **CFU-GM** 生长的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 3　Effects of stroma cells from the mice after 14-day irradiation on the CFU-GM growth in medium with agar layer($\bar{x}\pm s$)

		CFU-GM/10^5 nucleated cells in bone marrow			
		Control		R	
		CSF	Non-CSF	CSF	Non-CSF
Without agar layer	3 d	45.92±10.51	22.15±14.22	55.89±9.21	24.62±3.85
	7 d	52.85±6.47 #	22.61±11.27	44.81±6.35 #	20.53±3.25
With agar layer	3 d	81.65±7.33 **	4.02±0.63	86.23±15.45 *	4.64±0.28
	7 d	85.06±12.67 *	6.11±0.72	90.25±10.71 **	5.81±0.54

*: $P<0.05$,　**: $P<0.01$ *vs* without agar layer;
#: $P<0.05$ *vs* 3 d in the same group

3　讨论

基质细胞通过与造血细胞的直接接触、产生细胞因子, 参与造血调控。它们之间复杂的物质和信息交流的正常进行才使机体得以维持正常的造血过程[3~5]。Chukhlovin[6] 实验证明大剂量照射可损伤骨髓空间结构, 细胞与细胞间相互作用紊乱, 基质细胞产生细胞因子减少, 从而导致血液系统缓慢恢复。

小鼠骨髓基质细胞层能抑制接种的 CFU-GM 的生长, 以薄层琼脂分隔基质细胞贴壁与其上种植的靶细胞, 此种抑制作用明显减弱。说明抑制作用主要是通过细胞间近距离相互作用来实现的。当粒系培养体系中不加外源性集落刺激因子(CSF)时, 无基质细胞贴壁层的空白对照皿内, 未见 CFU-GM 生长, 靶细胞下有正常的及损伤鼠的基质细胞贴壁层时, 可见一定量 CFU-GM 集落生长, 正常及损伤组小鼠骨髓基质细胞上清液也能刺激少量 CFU-GM 集落生长, 这些结果表明, 贴壁层能分泌 CSF 样物质作用于粒系祖细胞而发挥其刺激作用。

Zipori[7,8] 用骨髓细胞孵育 2 周形成贴壁层, 移去培养基质后, 也见到粒系集落形成受抑, 同时, 还见到骨髓基质细胞层仍具有诱导 CFU-GM 生长的功能。Bentley[9] 也认为, CFU-GM 的生长增殖主要是基质细胞贴壁层上细胞间的相互作用。同时, 也存在体液性因子的作用。Toksoz[10] 也证明, 在长期培养后的早期, 可从条件液中分离出刺激因子, 刺激造血干细胞的 DNA 合成。

综上所述, 基质细胞对粒系祖细胞的生长增殖, 受基质细胞双向调节作用。①细胞间近距离相互作用表现为负调控, ②基质细胞分泌的体液因素, 则有利于粒系祖细胞增殖, 因此, 在促进放射损伤造血功能的恢复过程中, 可去除抑制因素, 促进基质细胞 CSF 样物质

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

加速分泌,以利于造血重建。

参考文献:

[1] 孔佩艳,郭朝华,罗成基,等.基质细胞对小鼠骨髓单个核细胞体外扩增的促进作用[J].第三军医大学学报,2001,23(8):891-894.
[2] 陈幸华,罗成基,郭朝华,等.放烧复合伤小鼠骨髓基质细胞体外成灶能力的变化[J].第三军医大学学报,1997,19(3):231-233.
[3] 郭朝华,罗成基,孔佩艳,等.放烧复合伤小鼠骨髓基质细胞对粒-巨噬系祖细胞生长的影响[J].中国实验血液学杂志,1999,7(1):65-68.
[4] 郭朝华,罗成基,孔佩艳,等.小鼠 15% III度烧伤时骨髓基质细胞对粒单系祖细胞生长的影响[J].中华创伤杂志,1999,15(3):187-189.
[5] Deryugina E I, Muller-Sieburg C E. Stuomal cells in long-term cultures: Keys to the elucidation of hematopoietic development[J]. Crit Rev Immunol, 1993,13(2):115-150.
[6] Chukhlovin A B, Mikhailova N B, Afanas'ev B V. Intracellular interactions in the hematopoietifc system after massive radiation expossure[J]. Radiats Biol Radioecol, 1994,34(4-5):537-543.
[7] Zipori D, Sasson T. Adherent cells from mounse bond marrow inhibit the formation of colong stimulating factor(CSF) induced myeloid colonies[J]. Exp Hematol, 1980,8(6):816-817.
[8] Zipori D. The renewal and differentiation of hemopoietic stem cell [J]. FASEB J, 1992,6(9):2 691-2 697.
[9] Bentley S A. Close range cell: cell interaction required for stem cell maintenace in continuous bone marrow culture[J], Exp Hematol, 1981,9(3):308-312.
[10] Toksoz D, Dexter T M, Lord B I, *et al*. The regulation of hemopoiesis in long-term bone marrow cultures II. Stimulation and inhibition of stem cell proliferation[J]. Blood, 1980,55(6):931-936.

(编辑 王 红)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2002)02-0128-01

易误诊为脊髓病变的肺癌脊髓转移 3 例分析

Misdiagnosis of metastatic pulmonary carcinoma at spinal cord as myeleterosis

严家川,蒋晓江,孙 鸣 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所神经内科,重庆 400042)

随着环境污染加剧,吸烟人群增加,肺癌的发生率越来越高。在全球、我国,肺癌的发病率和死亡率均占各种恶性肿瘤的首位,且呈上升趋势。肺癌易发生其它组织及器官的转移,在神经系统除脑部转移外,可发生脊髓转移而产生脊髓压迫症状。临床工作中以脊髓损伤症状为首发症状的肺癌脊髓转移,常因肺部症状不典型而易误诊为脊髓病变。我科 1998 年 4 月至 1999 年 9 月,共收本病 6 例,择其 3 例分析报告如下。

1 临床资料

病例 1:患者男性,54 岁,因腰痛半年,加重伴双下肢麻木、无力 1 周入院。患者入院前半年出现右侧腰部疼痛,近一周,疼痛加重,并伴双下肢麻木、无力,入院前 1 d,出现尿潴留。神经系统检查:胸 10 以下平面痛觉减退,双下肢肌力:左侧 3 级,右侧 2 级。膝反射左右(+),踝反射左右为(0),提睾反射左右(0),双侧 Babinski sign(+)。行颅脑及胸椎 MRI 检查,颅脑未见无异常,胸 9~10 椎体及右侧椎板、椎弓根溶骨性破坏及软组织肿块影,T1 低信号,T2 高信号,肿块向管椎内侵犯并压迫脊髓左移。诊断:胸 9~10 椎体病变,向椎管内侵犯及压迫脊髓。行胸部 X 光片检查,示"右肺上肺门有一约3.4 cm×5.0 cm不规则团块影,不均匀,呈分叶状"。诊断:右肺上叶中央型肺癌。行纤维支气管镜检查并活检,报告为小细胞未分化型肺癌。

病例 2:患者男性,46 岁,因右下肢麻木 2 月,加重伴烧灼感 1 月入院。患者于 2 月前出现右下肢麻木,先位于足背,以后发展至整个下肢,1 月前,麻木加重,并出现烧灼感,但疼痛不明显。查:右侧胸 8 平面以下痛觉减退,关节位置觉存在,双下肌力 5 级,双膝反射(++),双踝反射(++),双侧 Babinski sign(+)。行颅脑及胸椎 MRI 检查,颅脑未见无异常,胸 3~12 脊髓内有一长条状长 T1、长 T2 信号,水肿性改变。诊断:脊髓转移性肿瘤。行胸部 X 光片检查,示"右肺门旁一约4 cm×4.5 cm不规则形团块影,呈分叶状"。诊断:右肺中央型肺癌。手术证实为小细胞型肺癌。

病例 3:患者男性,62 岁,因右下肢无力 1 月,双下肢麻木、小便潴 1 周余入院。患者 1 月前出现双下肢无力,症状逐渐加重,以至不能独立行走。1 周前,出现双下肢麻木,针刺或烫伤不知,伴尿潴。查:胸 10 以下平面痛觉、温度觉缺失。双侧 Babinski sign(+)。行颅脑及胸椎 MRI 检查,颅脑未见异常,胸 8 椎体信号异常,T1 低信号,T2 高信号,增强扫描不规则轻度强化;胸段脊髓增粗,胸 4~7 平面脊髓 T1 低信号,T2 高信号,增强扫描有强化。诊断:胸 8 椎体及胸 4~7 平面脊髓病变。胸部 CT 检查,示"右肺下叶肺门有一类圆形软组织块影,边缘呈分叶状,密度不均匀,大小约 2.4 cm×2.2 cm"。诊断:右下肺中央型肺癌。行纤维支气管镜检查并活检,报告为小细胞未分化肺癌。

2 讨论

原发性肺癌,又称支气管肺癌,是最常见的肺部原发性恶性肿瘤。根据原发部位的不同,将起源于支气管、叶支气管的肺癌称为中央型肺癌;起源于分支气管及其以远的肺癌称为周围性肺癌。肺有两套血管供应,即肺循环的肺动脉、肺静脉和体循环的支气管动脉、支气管静脉,前者完成气体交换,是肺的功能血管;后者供应肺组织,包括肺血管的营养,是肺的营养性血管。支气管动脉左右侧均为 1~4 支,其中,右侧有 53.7% 起自 3~5 肋间动脉,约 2/3 的人右侧支气管动脉为 1 条,常与右肋间动脉共干(称肋间-支气管动脉干),而且支气管动脉与脊髓

(下转 131 页)

作者简介:严家川(1966-),男,云南省巧家县人,硕士,主治医师,讲师,主要从事脑出血机制及防治方面的研究。电话:(023)68757863

收稿日期:2000-06-16;修回日期:2001-01-18

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