DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.02.039
第24卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 2
202 2002年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)02-0202-03

小剂量MIP-1α联合IL-8体外对人骨髓造血细胞集落形成的影响

陆 华[1],潘 静[2],李招权[2],王庆余[1],彭贤贵[1] (第三军医大学:[1]附属新桥医院血液内科,重庆 400037;[2]医学检验系临床检验教研室,重庆 400038)

提 要:目的 了解小剂量巨噬细胞炎症蛋白-1α(Macrophage inflammatory protein-α MIP-1α)联合白细胞介素-8(Interleukin-8, IL-8)对人骨髓造血细胞集落形成的影响。方法 取人骨髓,根据随机单位组方差分析设计,将每例标本分为空白组(不加MIP-1α和IL-8);10 ng/ml联合组(加入10 ng/ml的MIP-1α和IL-8);1ng/ml联合组(加入1 ng/ml的MIP-1α和IL-8);单用MIP-1α组(加入20 ng/ml的MIP-1α);单用IL-8组(加入20 ng/ml的IL-8)。建立半固体培养体系,一定时间后,观察集落粒单细胞集落形成单位(CFU-GM)、红细胞集落形成单位(CFU-E)和混合集落(CFU-Mix)的形成情况。结果 1 ng/ml的浓度下,相同浓度的MIP-1α与IL-8联合使用对人骨髓造血细胞集落的形成没有明显的抑制作用;而在10 ng/ml的浓度下,两者联合使用则能明显地抑制人骨髓造血细胞集落的形成。两种因子单独使用,未见明显的集落形成抑制作用。结论 10 ng/mlMIP-1α与IL-8能相互协同抑制人骨髓造血细胞集落的形成。

关键词:MIP-1α;IL-8;骨髓造血细胞;集落
中图法分类号:R329.24;R331.22;R392.11 文献标识码:A

Effect of low dose MIP-1α combined IL-8 on clone formation of hurman lone marrow hematopoietic cells

LU Hua, PAN Jing, LI Zhao-quan, WANG Qing-yu, PENG Xian-gui (Department of Hematology, Xinqiao Hospital, Third Minatory Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To study the effect of low dose Macrophage inflamatory prolein-α (MIP-1α) combined with IL-8 on clone formation of human bone marrow hematopoietic cells. Methods Bone marrow hematopoietic cells were divided into 5 groups: control group (with no MIP-α or IL-8), 10 mg/ml combination group (with 10 ng/ml MIP-lx and 10 ng/ml IL-8), 1 mg/ml combination group (with 1 ng/ml MIP-lα and 1 ng/ml IL-8), MIP-lα group (with 20 ng/ml MIP), and IL-8 group (with 20 ng/ml IL-8). Then these cells were cultivated in 0.9% methyl cellulose system. Several days later, count the clones of CFU-GM, CFU-E and CFU-Mix of each group. Results At the concentration of 1 ng/ml, combination of MIP-1α and IL-8 didn't inhibit the clone formation but the 10 ng/ml combination group did obviously. Neither MIP-1α nor IL-8 alone did it in our study. Conclusion Combination of MIP-1α and IL-8 both at 10 ng/ml can coordinate each other to inhibit the clone formation of human bone marrow hematopoietic cells.

Key words: MIP-1α; interleukin-8; human bone marrow hematopoietic cells; clone

巨噬细胞炎症蛋白-1α(Macrophage inflammatory protein-α MIP-1α)和白细胞介素-8(interleukin-8 IL-8)都是多细胞来源的趋化因子,两者都有造血负调控因子的作用;但有效浓度较高,会导致一定程度的炎症反应。我们设计该实验,以期了解两者能否相互协同,在较低的浓度下抑制人骨髓造血细胞集落形成。

1 标本来源,材料和实验方法

1.1 标本来源

50例骨髓标本均取自本院住院或门诊病人,男30例,女20例,年龄5~64岁,平均年龄38岁。其中急性非淋巴细胞白血病(AML)M_1 3例(均为化疗后)、M_2 5例(4例化疗后,1例初诊)、M_3 9例(7例化疗后,2例初诊)、M_4 1例(化疗后);慢性淋巴细胞白血病(CLL) 4例(3例化疗后,1例初诊);急性淋巴细胞白血病(ALL)L_1 5例(4例化疗后,1例初诊)、L_2 5例(4例化疗后,1例初诊);非何杰金氏淋巴瘤(NHL) 8例(5例化疗后,2例放化结合治疗后,1例初诊);发热待查1例;肺癌化疗后1例;贫血待查3例;肝硬化1例;骨髓异常增生综合征(MDS)1例(初诊);缺铁性贫血(IDA) 3例。

1.2 材料和方法

1.2.1 材料 MIP-1α(Peprotech EC TLD,英国)购自晶美公司;IL-8、L-谷氨酰氨购自邦定泰克公司;IL-3、Epo、GM-CSF、SCF均由麒麟公司友情馈赠;DMEM(高糖),Gibaco公司产;甲基纤维素(粘滞度4 000mPa.s),Sigma公司产;淋巴细胞分离液(密度:1.077) d津TBD生物技术中心;2-巯基乙醇(2-ME),日本进口(分析纯)。

1.2.2 分组 根据随机单位组方差分析设计,每例标本分为空白组(不加MIP-1α和IL-8);10 ng/ml联合组(加入10 ng/ml的MIP-1α和IL-8);1 ng/ml联合组(加入1 ng/ml的MIP-1α和IL-8);单用MIP-1α组(加入20 ng/ml的MIP-1α);单用IL-8组(加入20 ng/ml的IL-8)。

1.2.3 方法 经肝素抗凝处理的骨髓与等量的DMEM液混合后,用淋巴细胞分离液分离(1 500 r/min,离心20 min)提取单个核细胞。DMEM液洗涤3遍(每遍1 000 r/min,离心5 min)。然后按表1配制培养体系。

作者简介:陆 华(1972-),男,重庆市人,硕士,主治医师,讲师,主要从事造血干细胞的保护方面的研究。电话:(023)68754015

收稿日期:2001-06-29;修回日期:2001-11-09

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

表 1　集落培养体系的配制

Tab 1　Content of clones culture system

Content	CFU-GM	CFU-E	CFU-Mix
2-ME (mol/L)			10^{-5}
L-glutamine (mol/L)	2	2	2
Epo (U/ml)		2	2
GM-CSF (ng/ml)	100		100
IL-3 (ng/ml)	100	100	100
SCF (ng/ml)			100
IL-8	Different concentration in different groups		
MIP-1α	Different concentration in different groups		
Penicillin (U/ml)	100	100	100
Streptomycin (U/ml)	100	100	100
Bovine serum (g/L)	10	10	10
Calf serum (ml/L)	100	100	100
Horse serum (ml/L)	200	100	100
Methyl cellulose (g/L)	9	9	9
DMEM	Appropriate measure		
Cells	2×10^5/ml		
Total volume of system (ml)	1	0.5	0.5

CFU-GM 用 24 孔板培养, 每孔 0.5 ml; CFU-E、CFU-Mix 用 96 孔板培养, 每孔 0.2 ml。每份标本作两孔。培养条件为: 37 ℃, 5%CO_2, 饱和湿度。3 d 后开始计数 CFU-GM 和 CFU-E 集落数, 7 d 后终止培养; 10 d 后开始计数 CFU-Mix 集落数, 14 d 后, 终止培养。集落判断标准: CFU-GM≥35 个细胞; CFU-E≥8 个细胞; CFU-Mix≥10 个细胞。

1.3　统计学处理

所得数据用随机单位组设计方差分析进行处理。

2　结果

2.1　CFU-GM 生长情况

实验结果表明, 1 ng/ml 浓度的 MIP-1α 与相同浓度的 IL-8 联合使用不能明显抑制人粒-巨噬细胞集落的形成; 10 ng/ml 浓度的 MIP-1α 与相同浓度的 IL-8 联用, 对于人粒一巨噬细胞集落的形成有明显的抑制作用。结果见表 2。

表 2　CFU-GM 生长情况 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　The growth of CFU-GM ($\bar{x}\pm s$)

	Control	MIP-1α+IL-8 (10 ng/ml)	MIP-1α+IL-8 (1 ng/ml)	MIP-1α (20 ng/ml)	IL-8 (20 ng/ml)
3 d	10.18±9.26	5.02±6.28 *	8.40±7.90	12.36±11.86	10.50±8.34
4 d	18.56±14.97	8.58±8.13 *	18.94±15.22	20.30±18.67	19.72±17.11
5 d	50.76±32.61	21.72±18.64 **	46.10±26.31	49.72±29.3	47.90±30.64
6 d	132.80±82.37	39.66±21.47 **	128.64±77.34	140.60±80.41	138.16±86.70
7 d	204.94±145.35	71.92±40.61 **	194.28±128.64	211.40±150.33	199.88±148.36

*: $P<0.05$; **: $P<0.01$ *vs* control

2.2　CFU-E 生长情况

CFU-E 的生长情况与 CFU-GM 的生长情况相似。结果见表 3。

表 3　CFU-E 生长情况 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 3　The growth of CFU-E ($\bar{x}\pm s$)

	Control	MIP-1α+IL-8 (10 ng/ml)	MIP-1α+IL-8 (1 ng/ml)	MIP-1α (20 ng/ml)	IL-8 (20 ng/ml)
3 d	6.16±5.04	2.14±3.54 *	7.08±6.91	6.64±6.49	6.92±6.71
4 d	11.70±8.64	5.20±4.17 **	13.52±9.07	12.88±8.98	14.70±10.53
5 d	29.84±16.83	13.48±10.65 **	31.46±20.33	29.46±17.39	30.88±20.60
6 d	68.42±45.32	29.62±21.38 **	74.60±49.67	71.22±47.68	66.98±41.35
7 d	124.68±89.56	54.62±43.11 **	134.62±91.48	131.20±87.63	127.94±88.51

*: $P<0.05$; **: $P<0.01$ *vs* control

2.3　CFU-Mix 生长情况

CFU-Mix 的生长情况也与 CFU-GM 的生长情况相似。结果见表 4。

表 4　CFU-Mix 生长情况 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 4　The growth of CFU-E ($\bar{x}\pm s$)

	Control	MIP-1α+IL-8 (10 ng/ml)	MIP-1α+IL-8 (1 ng/ml)	MIP-1α (20 ng/ml)	IL-8 (20 ng/ml)
10 d	3.22±4.04	0.86±2.74 *	2.94±3.22	3.86±4.19	3.08±3.46
11 d	7.40±7.11	3.12±3.65 **	5.86±5.47	7.94±7.63	6.62±6.34
12 d	16.98±13.11	7.20±7.13 **	14.30±10.21	19.60±16.47	17.40±14.33
13 d	44.42±32.19	15.58±12.86 **	40.90±28.67	49.82±36.77	46.58±32.13
14 d	91.46±72.34	31.60±24.31 **	86.58±68.53	96.38±80.53	93.62±77.34

*: $P<0.05$; **: $P<0.01$ *vs* control

3　讨论

MIP-1α 是一种多细胞来源的炎症因子, 属趋化因子中的 cc 亚群[1]。近年来研究发现 80%以上的 CD_{34}^{+} 细胞表达 MIP-1α 受体[2], MIP-1α 能特异性地将这些细胞抑制于 G_0/G_1 期, 进而产生对化疗药物的耐受, 而对其它细胞, 包括表达 MIP-1α 受体的白血病细胞无此作用[3,4], 因此认为 MIP-1α 具有特异性的保护造血干/祖细胞的作用。但 MIP-1α> 20 ng/ml 的浓度下, 会自发聚合, 形成多聚体而降低其生物活性[5]。体外研究结果表明, 单用 MIP-1α 的最佳效应剂量为 100 ng/ml; 临床研究也表明, 其有效剂量在 100 μg/kg 左右[4], 在这样的浓度下, 除了聚合作用外, 还会产生较强的炎症反应。因而限制了它在临床上的广泛应用。

IL-8 也是一种多细胞来源的中性粒细胞趋化因子, 属趋化因子中的 c-x-c 亚群[6]。近年来的研究表明, IL-8 也有造血负调因子的作用[7], 其受体与 MIP-1α 受体属不同家族, 且信号转导途径也不一样[8,9]。

集落生长实验, 是检测集落形成细胞增殖能力的一个常用的、简单有效的方法。骨髓细胞集落, 尤其是 CFU-Mix 的形成情况, 往往可以比较准确地反应骨髓早期细胞的增殖能力。本实验设立两个不同浓度的联合组、单用 MIP-1α 组、单用 IL-8 组和空白对照组, 比较各组的集落形成情况, 结果表明, MIP-1α 和 IL-8 存在显著的协同效应, 两者联合使用, 在 10 ng/ml 的浓度下就能明显抑制人骨髓造血细胞各种集落的形成。其中 CFU-GM 和 CFU-E 从第 3 d 起, CFU-Mix 从第 10 d 起 10 ng/ml 联合组的集落数就与其它组有了显著差异; 越往后, 差异越明显。通常越早期的造血细胞形成集落的时间越晚, 因此我们推论, 两种因子联合使用对早期造血干/祖细胞的增殖抑制作用更为显著。而当两种因子单独使用时, 即便浓度增加到 20 ng/ml, 也未见有集落形成抑制作用, 从而证明了两种因子的协同作用。

小剂量的 MIP-1α 联合 IL-8 抑制人骨髓造血细胞的增殖, 尤其是对于早期造血干/祖细胞增殖的抑制, 对于临床上各种肿瘤化疗过程中的造血干/祖细胞的保护有着潜在的应用价值。但在同样药物浓度下它们

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

对于肿瘤细胞(尤其是白血病细胞)是否存在相同的作用?两种因子在炎症趋化作用上会不会也存在协同增强效应?10 ng/ml 的浓度是否最低有效浓度等,都是在两种因子推向临床的过程中必须解决的问题。

参考文献:

[1] Wolpe S, Cerami A. A Macrophage inflammatory proteins 1 and 2: members of a novel superfamily of cytokines[J]. Faseb J, 1989, 3(9): 2 565—2 573.

[2] Nicholls S E, Lucas G, Graham G J, *et al*. Macrophage-inflammatory protein-1 alpha receptor expression on normal chronic myeloid leukemia $CD34^+$ cells[J]. J Immunol, 1999, 162(10): 6 191—6 199.

[3] Lord B I, Dexter T M, Clments J M, *et al*. Macrophage-inflammatory protein protects multipotent hematopoietic cells from the cytotoxic effects of hydroxyurea *in vivo*[J]. Blood, 1992, 79(7): 2 605—2 609.

[4] Owen LYNCH P J, Adans J A, Brereton M L, *et al*. The effect of chemokine rh MIP-1α and a non-aggregating variant BB-10010 on blast cells from patients with acute myeloid leukemia[J]. Bri J Haematol, 1996, 95(2): 77—84.

[5] Gilomore G L, Depasquale D K, Shadduck R K, *et al*. Cell cycle regulation protective of BB-10010 treatment on chemotherapy—induced neutropenia in mice[J]. Exp Hemetol, 1999, 27(3): 195—202.

[6] Owen LYNCH P J, Czaplewski L G, Hunter M G, *et al*. The growth inhibitory role and potential clinical value of macrophage inflammatory protein 1 alpha in myeloid leukemias[J]. Ieuk Lymphoma, 1998, 30(2): 41—53.

[7] Hermouet S, Corre I, Lippert E, *et al*. Interleukin-8 and other agonist of Gi2 protein: antocrine paraceine growth factors for human hematopoietic progenitors acting in synergy with colony stimulating factors[J]. Leuk Lymphoma, 2000, 38(1—2): 39—48.

[8] Mantel C, Aronica S, Luo Z, *et al*. Macrophage inflammatory pretein-1 alpha en hance growth factor stimulated phosphatidylcholine metabolisms and increase cAMP levels in the human growth factor dependent cell line Mo7e events associated with growth suppression[J]. J Immanol, 1995, 154(5): 2 342—2 350.

[9] 曾慧兰. 白细胞介素 8 及其受体与白血病关系进展[J]. 国外医学: 输血及血液学分册, 1997; 20(6): 337—340.

(编辑 谢义霞)

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2002)02-0204-02

氪激光结合中药治疗视乳头小凹合并黄斑部浆液性脱离 1 例

Treatment of a case of pit of optic disc associated with macula detachment by Kr laser and traditional Chinese herbs

江文珊, 阴正勤, 孟晓红, 余 涛 (第三军医大学附属西南医院眼科, 重庆 400037)

先天性视乳头小凹是一种少见的发育障碍性疾病,可合并黄斑部视网膜浆液性脱离,严重影响患者视功能。本科收治 1 例先天性视乳头小凹合并黄斑部视网膜浆液性脱离患者,经用氪激光及中药结合治疗后取得满意效果,现报告如下。

1 临床资料

陈某,女,38 岁。于 1999 年 7 月 30 日就诊,诉左眼视力下降 1 周伴视物变形。眼部检查:右眼正常。左眼视力 0.1,左外眼及眼前节正常,眼底见视乳头较右眼大,面积约 5.414 mm^2(右眼视乳头面积约 1.945 mm^2),下方视乳头可见一面积约 1.199 mm^2 椭圆形浅黄色凹陷,深度约 4 D,伴视乳头下弧,视乳头颞下方约 7× 7 视乳头直径(PD)范围局限性视网膜浆液性脱离,波及黄斑部,见图 1。眼底荧光血管造影显示:动脉期视乳头小凹处呈低荧光,静脉期以后小凹中有染料渗漏,逐渐增强,晚期小凹内充满荧光,颞下方脱离区有淡染料积存,见图 2。吲哚青绿造影示:早期乳头颞下方即可见圆形浅淡荧光池,透过荧光池可见下方粗大的脉络膜血管,晚期染料积存,荧光池边界清楚。

作者简介: 江文珊(1972—),女,重庆市西阳县人,硕士,医师,主要从事眼底病方面的研究。电话: (023)68754402

收稿日期: 2001-05-15; 修回日期: 2001-12-20

于 1999 年 8 月 6 日在表麻下行左眼视乳头小凹周围盘缘外氪红激光交错式光凝,光斑直径 100 μm,能量 120~200 mW,爆光时间 0.1 s,59 点,Ⅰ级光斑反应。随访 2 月病情无缓解,局部浆液性脱离范围稍扩大,黄斑囊样水肿,视力下降至 0.06。于 1999 年 10 月 18 日以氪红激光在小凹颞侧及下方盘缘外行增强光凝,同时以氪黄激光光凝网膜脱离边缘以阻止网脱范围扩大,光斑直径 50~200 μm,能量 120~220 mW,爆光时间 0.07~0.1 s,132 点,Ⅰ~Ⅱ级光斑反应。患者同时有白带增多,胸脘痞闷,食欲差等症状,舌淡苔白腻,脉细。辨证为脾虚湿滞,以中药参苓白术散加减配合治疗(党参 20 g、茯苓 12 g、白术 10 g、扁豆 15 g、山药 10 g、苡仁 30 g、泽泻 12 g、当归 12 g、郁金 10 g、柴胡 12 g、肉桂 3 g,共 10 剂口服)。11 月 5 日复查,左眼视力 0.1,黄斑区上方网膜隆起降低,网膜脱离范围缩小,以氪黄激光光凝缩小的网膜脱离边缘,光斑直径 200 μm,能量 190 mW,爆光时间 0.15 s,252 点,Ⅱ级光斑反应,继续配以中药参苓白术散加减内服。11 月 30 日复查,黄斑下方仍局限性网脱,以氪红激光行小凹颞下方盘缘外重复光凝,同时对脱离边缘环绕光凝,光斑直径 100~200 μm,能量 140~190 mW,爆光时间 0.1~0.15 s,35 点,Ⅱ级光斑反应。12 月 22 日复查,左眼视力 0.3,后极部网膜复位,黄斑区色暗红,少许皱褶及色素沉着。随访半年视力增至 0.4,无复发,见图 3。

(下转 211 页)

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