DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.05.018

文章编号:1000-5404(2000)05-0445-03

论著

小鼠 6 Gy 全身照射后巨噬细胞对造血的抑制效应研究

蒲晓允[1],陈晓莉[1],邓 均[1],罗成基[2],潘 静[2],李招权[1],张 良[1] (第三军医大学:[1]医学检验系临床血液学教研室;[2]预防医学系防原医学教研室、全军复合伤研究所;重庆 400038)

提 要:目的 探讨放射损伤后巨噬细胞对血细胞生成的负性调节作用。方法 昆明种雄性小鼠经 6 Gy ^{60}Co γ 射线一次性全身照射后,检测辐照后 1、3、7、15 d 腹腔巨噬细胞(PCMΦ)数量和吞噬墨汁的能力;用 ELISA 和放免法检测巨噬细胞培养上清 TGF-β_1、MIP-1α 和 TNFα 的含量;将不同数量的巨噬细胞加入骨髓有核细胞中,观察其对 CFU-E 和 CFU-GM 形成的影响;骨髓有核细胞剔除 Mac-1$^+$ 细胞及再加入不同比例的巨噬细胞后对 CFU-E 和 CFU-GM 形成的影响。结果 ①放射损伤后巨噬细胞吞噬功能增强;培养上清 TNFα、TGF-β_1 和 MIP-1α 水平升高;经 LPS 刺激后放射损伤组巨噬细胞培养上清此 3 种因子的水平无显著改变。②骨髓细胞中当加入 10%以上正常巨噬细胞时生成的 CFU-E 和 CFU-GM 数量明显减少,当加入相同比例的放射损伤巨噬细胞生成的 CFU-E 和 CFU-GM 数量减少更加显著。③剔除 Mac-1$^+$ 细胞后的骨髓细胞生成 CFU-E 和 CFU-GM 数量增加,当再加回巨噬细胞数量又减少。结论 放射损伤后巨噬细胞被激活,造血抑制活性增强,这可能是放射损伤骨髓造血功能受抑的原因之一。

关键词:巨噬细胞;放射损伤;造血抑制
中图法分类号:R329.2;R818 文献标识码:A

Effects of macrophages on hemopoiesis after total body irradiation in mice

PU Xiao-yun, CHEN Xiao-li, DENG Jun, LUO Cheng-ji, PAN Jin, LI Zhao-quan, ZHANG Liang (Department of Clinical Hematology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the effects of peritoneal macrophages on hemopoiesis after total body irradiation of gamma rays in mice. Methods Male Kumming mice were exposed to total body irradiation of 6 Gy of gamma rays from ^{60}Co. The number of peritoneal macrophages was counted and their ability to phagocytose ink was observed on the 1st, 3rd, 7th and 15th day after irradiation. The content of TNFα, TGF-β_1 and MIP-1α in the supernatant of the culture medium of the macrophages was determined with ELISA and radioimmunoassay. Different proportions of normal and irradiated macrophages were added to bone marrow cells to observe their effects on the formation of CFU-E and CFU-GM. Results ①The phagocytic ability was stronger in the irradiated macrophages than in the normal ones. The content of TNFα, TGF-β_1 and MIP-1α was increased in the supernatant of the culture medium of the irradiated macrophages but showed no significant changes in that stimulated with LPS. ②The formation of CFU-E and CFU-GM was obviously decreased when normal macrophages was added to the bone marrow cells and it was more obviously decreased when 10% irradiated macrophages was added. ③The formation of CFU-E and CFU-GM was increased after the depletion of Mac-1 cells but decreased again when irradiated macrophages were added. Conclusion The decline of hemopoiesis in the bone marrow after radiation injury might be due to the fact that the radiation-activated macrophages intensify their inhibition on hemopoiesis.

Key words: macrophage; radiation injury; hemopoiesis inhibition

虽然骨髓巨噬细胞仅占骨髓有核细胞的很小比例,但是骨髓巨噬细胞的功能活跃,且与造血细胞有密切的相互作用,因此它对血细胞的生成有很重要的影响。本研究将探讨放射损伤后巨噬细胞的数量和功能的改变,以及这些改变与放射损伤后血细胞生成的关系。

1 材料与方法

1.1 实验动物

昆明种雌性小鼠(本校动物所提供),体重(22.51±0.85)g,随机分为对照组与实验组,并选定放射后 1、3、7 和 15 d 为检

作者简介:蒲晓允(1963—),男,四川省南充市人,博士,副教授,主要从事造血调控方面的研究,发表论文 15 篇。电话:(023)68752312

收稿日期:1999-07-20;修回日期:1999-12-30

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

测点。

1.2 照射条件

^{60}Co γ 射线全身一次性照射 6 Gy，剂量率 1.143～1.211 Gy/min，照射后普通喂养。

1.3 PCMΦ 制备

将小鼠从股动脉放血致死，消毒腹部皮肤，腹腔注入预冷的 EDTA-1640(EDTA 浓度为 0.02 mmol/L)5 ml，剥去皮肤层，吸出注入的 1640 液，离心(1 500 r/min，5 min)，弃上清，加入含 20%胎牛血清的 1640 液 2 ml，使细胞悬浮，等量分装于两只 35 mm 培养皿，放 37℃，5%CO_2 孵育 2 h 后，洗去非粘附细胞，用细胞刮匙将贴壁细胞刮下，备用。

1.4 PCMΦ 培养

胎牛血清 20%(北京军事医学科学院产品)，1640 80%(GIBCO 公司)，青、链霉素各 100 u/ml，细胞浓度 5×10^5 个细胞/ml，每个时相点均培养二组 PCMΦ(即无 LPS 组和加 LPS 组，LPS 浓度为 25 μg/ml)，放 37℃，5%CO_2 孵箱 12 h 后收集上清，用 4%多聚甲醛固定底层贴壁细胞，备用。

1.5 CFU-E 和 CFU-GM 培养

参照刘秀珍[1]一文，其中加巨噬细胞组，分别按对照组中骨髓有核细胞数的 5%、10%和 20%加入巨噬细胞。

1.6 $Mac\text{-}1^+$ 细胞分选

Mac-1 单抗标记磁珠购于美国 MACS 公司，并按说明书要求在磁性分选仪上分选出 $Mac\text{-}1^+$ 和 $Mac\text{-}1^-$ 细胞。将 $Mac\text{-}1^-$ 细胞按 1.5 中方法培养 CFU-GM 和 CFU-E。

1.7 上清 TNFα、$TGF\text{-}\beta_1$ 和 MIP-1α(巨噬细胞炎性蛋白-1α)测定

按 TNFα 放免试剂盒(购于北京军事医学科学院)，$TGF\text{-}\beta_1$ ELISA 试剂盒(美国 Genzyme 公司产品)及 MIP-1α ELISA 试剂盒(美国 INTERGEN 公司产品)说明书要求进行检测。

1.8 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，以 t 检验分析组间差异的显著性。

2 结果

2.1 放射损伤对 PCMΦ 数量和吞噬功能的影响

放射损伤后从每只小鼠腹腔收集的 PCMΦ 总数在各时相点均显著减少($P<0.01$)，第 7 天后开始回升，15 d 尚未达正常水平；1 h 墨汁吞噬试验显示：放射损伤后 PCMΦ 吞噬功能显著增强，与对照组差异显著($P<0.01$)；加 LPS 后放射组吞噬率变化不显著($P>0.05$)；但对照组加 LPS 后吞噬率升高显著($P<0.01$)，见表 1。

表 1 放射损伤后 PCMΦ 数量及吞噬率的改变

Tab 1 Changes of macrophage number and phagocytic ratio(%) after radiaton injury

	Control	1 d	3 d	7 d	15 d
Number(1×10^6)	3.81±0.22	1.09± 0.99△△	0.85± 0.07△△	1.62± 0.23△△	2.03± 0.31△
Ratio(without LPS)	31.23±5.41	71.68± 9.36△△	69.62± 9.12△△	71.75±13.17△△	66.52± 8.60△△
Ratio(with LPS)	51.48±6.21*	78.75±11.11	81.84±12.45	69.73±12.54	70.33±12.35

△：$P<0.05$，△△：$P<0.01$ *vs* control；*：$P<0.01$ *vs* without LPS

2.2 培养上清 TNFα、$TGF\text{-}\beta_1$ 及 MIP-1α 的含量变化

PCMΦ 培养上清中 TNFα 和 $TGF\text{-}\beta_1$ 浓度在放射损伤后 1、3、7 d 较对照组显著升高($P<0.05$)，15 d 时恢复至正常水平；MIP-1α 在各时相点均较对照组显著升高($P<0.01$)，但放射损伤后随时间的延长其水平逐渐降低。对照组 PCMΦ 加 LPS 后 TNFα 和 MIP-1α 含量显著升高($P<0.01$)，$TGF\text{-}\beta_1$ 无显著改变；放射损伤组加 LPS 后 3 种因子的含量与相应组差异无显著性($P>0.05$)，见表 2。

表 2 PCMΦ 培养上清 TNFα、$TGF\text{-}\beta_1$ 和 MIP-1α 含量的变化(ρ_B/ng·ml^{-1})

Tab 2 Change of TNFα、$TGF\text{-}\beta_1$ and MIP-1α content in supernatant of cultured PCMΦ (ρ_B/ng·ml^{-1})

	Control	1 d	3 d	7 d	15 d
TNF-α(without LPS)	0.71±0.05	0.91±0.09△	0.92±0.10△	0.85±0.07△	0.72±0.06
(with LPS)	0.98±0.14*	0.88±0.10	1.17±0.21	0.90±0.11	0.09±0.07
$TGF\text{-}\beta_1$(without LPS)	0.73±0.01	0.86±0.07△	0.96±0.12△	0.89±0.07△	0.77±0.12
(with LPS)	0.82±0.11	0.93±0.06	1.04±0.15	0.79±0.09	0.88±0.15
MIP-1α(without LPS)	<0.06	0.30±0.02△△	0.27±0.05△△	0.19±0.04△△	0.10±0.04△△
(with LPS)	0.12±0.03**	0.27±0.04	0.0 ±0.06	0.16±0.04	0.15±0.03

△：$P<0.50$，△△：$P<0.01$ *vs* control；*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* without LPS

2.3 巨噬细胞数量对 CFU-E 和 CFU-GM 形成的影响

在无放射损伤组(A 组)，当培养体系中 PCMΦ 比例为 10%时，CFU-E 集落数量显著减少($P<0.05$)，CFU-GM 的数量无显著改变($P>0.05$)，当加入的 PCMΦ 比例为 20%时，CFU-E 和 CFU-GM 均明显减少，差异显著($P<0.01$)。当培养体系中加入放射损伤组 PCMΦ(B 组)的比例为 5%时，CFU-E 集落数明显

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

减少($P<0.05$); 而当 PCMΦ 比例为 10%时, CFU-GM 数量与对照组差异非常显著($P<0.01$), 随着加入 PCMΦ 比例的增加 CFU-E 和 CFU-GM 进一步减少。剔除 $Mac\text{-}1^+$ 细胞后的正常骨髓有核细胞(C 组), 生成 CFU-E 和 CFU-GM 的数量均显著增加, 但当把未经照射的 PCMΦ 再加回到 $Mac\text{-}1^-$ 细胞, 生成的 CFU-E 和 CFU-GM 又减少, 其减少的程度与加入 PCMΦ 的比例有关, 见表 3。

表 3　PCMΦ 数量对 CFU-E 和 CFU-GM 形成的影响

Tab 3　Effect of macrophage number on CFU-E and CFU-GM

	Control	Cell dep	Macrophage number		
			5%	10%	20%
A	CFU-E	33.41± 5.19		27.45± 4.34	10.68± 1.19
	CFU-GM	201.49±19.35		210.14±22.59	137.21±15.45
B	CFU-E	33.41± 5.19		8.45± 1.29	9.37± 1.57
	CFU-GM	201.49± 5.19		113.45±14.36	107.45±12.71
C	CFU-E	33.41± 5.19	45.32± 3.78	32.57± 4.189	26.41± 5.18
	CFU-GM	201.49±19.35	261.75±27.31	189.45±21.11	174.21±19.35

A: normal macrophage; B: radiated macrophage

C: without macrophage

3　讨论

骨髓巨噬细胞对血细胞的生成有两方面的作用, 一是促进血细胞生成作用, 即通过细胞间相互作用和表达细胞刺激因子促进血细胞的分化与增殖[2~4]; 另一方面是抑制血细胞的生成, 主要通过分泌对血细胞增殖与分化有抑制作用的细胞因子(如 TNFα、$TGF\text{-}\beta_1$、MIP-1α 等)来实现[5]。在生理条件下巨噬细胞分泌的正负细胞因子是相对稳定的。由于不同的骨髓细胞对射线敏感性的差异以致放射损伤后骨髓细胞的种类、细胞间的比例和细胞功能都出现明显的改变, 如巨噬细胞可能被激活[6], 激活后的巨噬细胞表达细胞因子的种类、量以及吞噬细胞的功能都会发生相应改变, 从而影响血细胞的生成。

本实验提取的 PCMΦ 经形态学和非特异性酯酶染色证实其纯度达 90%以上, 台盼蓝试验其活度达 95%以上。表 1 结果显示放射损伤后巨噬细胞的吞噬活性明显增强, 同时辐照后 PCMΦ 用 LPS 刺激, 并不能显著提高 PCMΦ 对墨汁的吞噬率, 而 LPS 能显著提高未放射 PCMΦ 对墨汁的吞噬率, 均表明放射损伤后的巨噬细胞已处于活化状态。实验也表明: 放射损伤后的 PCMΦ 培养上清中 TNFα、$TGF\text{-}\beta_1$ 和 MIP-1α 的水平均显著升高, 随着损伤后时间的推移它们的量均逐渐降低, 其变化的趋势与 PCMΦ 吞噬活性的变化基本一致。

由于放射损伤后巨噬细胞的吞噬功能增强以及释放的造血抑制因子的量明显增加, 表明此时巨噬细胞对造血的负调节活性可能增强。为了进一步验证这一推断我们首先用免疫磁珠分选法将 Mac-1 阳性细胞从正常骨髓细胞中剔除, 这一方法可使 80%的骨髓巨噬细胞被剔除掉[7], 结果 Mac-1 阴性骨髓细胞形成CFU-E和CFU-GM的能力均增强; 但当 Mac-1 阴性骨髓细胞中加入一定比例(如大于 10%)的未经辐照的腹腔巨噬细胞后, 生成的 CFU-E 和 CFU-GM 数量又显著减少, 表明正常情况下只要巨噬细胞增加到一定比例就会对造血产生抑制, 这主要与巨噬细胞分泌造血抑制因子有关; 另外, Goliaei[8] 的实验结果提示巨噬细胞增加到一定比例后, 会影响长期骨髓细胞培养体系中基质细胞的融合, 损伤基质细胞对造血的支持作用, 从而影响造血, 即巨噬细胞对造血微环境也可产生损伤效应。当骨髓细胞中加入放射损伤后的 PCMΦ, 在巨噬细胞比例条件下, 较未照射的PCMΦ组形成的 CFU-E 和 CFU-GM 数量更少, 提示在放射损伤条件下, 巨噬细胞对造血的抑制或破坏作用更加显著, 这可能与放射损伤巨噬细胞被激活表达造血抑制因子增加及吞噬功能增强有关。

总之, 骨髓巨噬细胞对造血的双向调节作用在放射损伤后其平衡被破坏, 使负性调节作用增强, 这是放射损伤时骨髓造血功能障碍的原因之一。因此采取一些调节巨噬细胞功能的措施, 对恢复造血功能应是有益的。

参考文献:

[1] 刘秀珍 著. 造血祖细胞培养技术实验手册[M]. 北京: 北京出版社, 1993. 102.

[2] Cordon S. Macrophage interations with haematopoietic cell[M]. Pairs: C R Acad Sci, 1992. 314－315.

[3] Durum S K, Oppenheim J J. Macrophage-derived mediators: Interleukin-1, tumor necrosis factor, interleukin-6, interferon, and related cytokines[A]. In: Paul W E ed. Fundamental Immunology[M]. New York: Raven Press, 1980. 639.

[4] Takemure R, Werb I. Secretory products of macrophages and their physiological function[J]. Exp Hematol, 1984, 246(2): C1.

[5] Broxmeyer H E, Najman A, Dainiak N. Summary of meeting on negative regulators of hematopoiesis[J]. Exp Hematol, 1991, 19(2): 149－152.

[6] Nothdurft W, Fliedner T M, Fritz T E, *et al*. Response of hematopoiesis in dog to continuous low dose rate total body irradiation [J]. Stem Cells Dayt, 1995, 13(Suppl 1): 261－267.

[7] Chang Q, Wang K B. The role of macrophages in the regulation of erythroid colony growth *in vitro*[J]. Blood, 1992, 80(7): 1 702－1 708.

[8] Goliaei B, Soheili Z, Behbodd A. Hematopoiesis in the presence of macrophages in long-term bone marrow cultures[J]. Exp Hematol, 1995, 23(3): 1 115－1 120.

(编辑　冷怀明)

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