DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.09.012

放烧复合伤对骨髓基质细胞血小板生成素基因表达的影响

黄洪涛* 罗成基 郭朝华 周燕虹 (第三军医大学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: 研究 5 Gy γ射线放射损伤复合 15% Ⅲ度烧伤小鼠骨髓基质细胞血小板生成素 (TPO)基因表达的影响。方法: 采用骨髓基质细胞培养、逆转录聚合酶链式反应、斑点杂交和原位杂交技术检测基质细胞 TPO mRNA。结果: 发现各伤组动物股骨骨髓巨核细胞数和外周血血小板数分别在伤后第 7、13天和第 3、7天降到最低值。骨髓基质细胞 TPO mRNA量于伤后第 3、13天出现明显的组间差异,表现在放射组和烧伤组明显低于正常水平,而复合伤组则明显高于正常值。两个时相点的变化趋势一致。结论: 放烧复合伤后骨髓基质细胞分泌 TPO的活性较单纯放射损伤和单纯烧伤活跃。

关键词 放烧复合伤;骨髓基质细胞;血小板生成素;基因表达
中图法分类号 R322.2; R644; R818

骨髓基质细胞是骨髓造血诱导微环境的重要组成部分,是造血细胞定居、增殖、成熟及释放的内环境。骨髓基质细胞通过与造血细胞接触并释放细胞外基质和造血细胞因子调节造血。骨髓基质细胞自身分泌血小板生成素 (Thrombopoietin, TPO)从而调控血小板的生成。本实验从骨髓基质细胞入手,研究放射损伤、烧伤和放烧复合伤后该细胞 TPO基因表达量的改变,进一步认识放烧复合伤后骨髓造血诱导微环境对血小板生成的促活化作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物分组及致伤

昆明种胎鼠 40只,体重 1~2 g,成年小鼠 200只,体重 20~24 g,随机分为 4组:① 正常对照组 (N);② 放射组 (R): ^{60}Co γ射线一次全身照射 5.0 Gy;③ 烧伤组 (B): 30% 凝固汽油燃烧 7 s致背部 15% TBSA Ⅲ度烧伤;④ 复合伤组 (C): 照射后 30 min内实施烧伤。

1.2 观察指标和方法

1.2.1 股骨骨髓巨核细胞和外周血血小板计数 于伤后 8 h及 1、2、3、5、7、10、13、15、20、25、30 d剪尾取血,行颈椎脱臼活杀后自股骨冲出骨髓,光镜下计数外周血血小板和骨髓巨核细胞。

1.2.2 骨髓基质细胞培养 培养体系中含有 15% 马血清,10% 小牛血清, 1×10^{-3} mmol/L氢化可的松, 2×10^{6}/ml骨髓有核细胞。37℃、5% CO_2饱和湿度的培养箱中培养 21 d。每周半量换液 1次。

1.2.3 骨髓基质细胞 TPO mRNA检测

1.2.3.1 逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 收集基质细胞并提取总 RNA, RT-PCR扩增 630 bp的 TPO cDNA片段;以次黄嘌呤磷酸核糖转移酶 (HPRT)作为内参照。循环参数: 94℃ 90 s, 56℃ 120 s, 70℃ 60 s,共 35个循环,结束前 72℃延伸 10 min,图像分析各组电泳条带的紫外吸收程度。

1.2.3.2 斑点杂交 从 TPO的主要来源部位,即正常胎鼠肝细胞提取总 RNA,通过 RT-PCR技术扩增 TPO基因特异性片段,回收并制备探针后,培养骨髓基质细胞总 RNA的斑点杂交。

1.2.3.3 原位杂交 利用上述制备的探针,行培养骨髓基质细胞原位杂交,进一步在细胞形态学方面确定各组 TPO mRNA转录水平的差异。

1.3 统计学分析

采用 SPLM2.3软件对结果进行统计学分析,数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示。

2 结果

2.1 伤后小鼠股骨骨髓巨核细胞数量的变化

正常组每根股骨有 (8 600± 374)个巨核细胞。伤后 8 h 3个伤组均明显低于正常组。直到 30 d,放射组和复合伤组仍显著低于正常组。烧伤组与正常组已无明显差别。放射组在伤后第 7天、烧伤组和复合伤组在伤后第 13天降到最低点,见图 1。

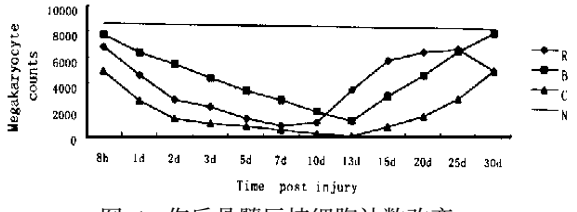


图 1 伤后骨髓巨核细胞计数改变

Fig 1 The change of MK counts after injury

2.2 伤后外周血血小板数量的变化

各组在伤后 8 h外周血血小板即出现显著的减少。第 3天烧伤组与复合伤组降到最低,而放射组第 7天才达到最低,伤

* 黄洪涛,男,29岁,助教,硕士

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

后 15 d烧伤组血小板数已基本恢复正常,见图 2

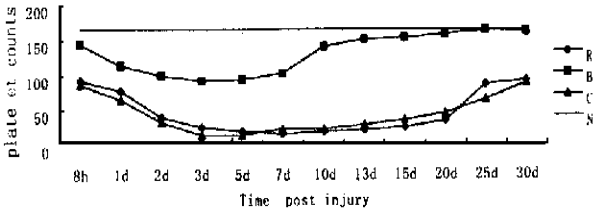


图 2　伤后血小板计数改变

Fig 2　The change of platelet counts after injury

2.3　伤后小鼠骨髓基质细胞 TPO mRNA的改变

2.3.1　RT-PCR结果　　无论是伤后 3 d或 13 d,各组 TPO表达活性表现出相似的变化趋势,即复合伤组> 正常对照组> 放射组 > 烧伤组,组间比较存在显著差异。同时,伤后第 13天各组 TPO mRNA量较第 3天明显下降,见表 1

表 1　伤后小鼠骨髓基质细胞 **TPO mRNA**灰度分析 (**AOD**)

Tab 1　TPO mRNA expression in mouse bone marrow stromal cells after injury (AOD)

Date	R	B	C	N
3 d	33.43± 4.20**##△△	20.58± 2.68**##	85.37± 5.04*	55.47± 6.41
13 d	27.99± 5.50**##△△	4.82± 0.81**##	70.42± 6.89*	51.82± 6.03

R Radiation; B Burn; C Combined injury; N: Normal;

** : $P < 0.01$ *vs* N;## : $P < 0.01$ *vs* C;△△: $P < 0.01$ *vs* B

2.3.2　斑点杂交结果　　各致伤组 TPO mRNA表达量排列顺序与 RT-PCR一致,不同之处在于烧伤组和复合伤组第 13天 TPO mRNA表达量较第 3天明显升高,见表 2

表 2　伤后小鼠骨髓基质细胞 **TPO mRNA**斑点杂交灰度分析 (**AOD**)

Tab 2　TPO mRNA dot blot analysis in mouse bone marrow stromal cells after injury (AOD)

Date	R	B	C	N
3 d	51.88± 5.61**##△△	19.20± 3.87**#	65.41± 3.89*	55.79± 4.97
13 d	45.77± 4.89#△△	28.75± 3.06**#	68.80± 6.64*	57.01± 6.17

* : $P < 0.05$,** : $P < 0.01$ *vs* N;# : $P < 0.05$,

: $P < 0.01$ *vs* C;△△: $P < 0.01$ *vs* B;

2.3.3　原位杂交结果　　光镜下可见,杂交的阳性产物为蓝色或紫蓝色颗粒,分布于细胞浆。主要的染色阳性细胞呈多角形和梭状特征的成纤维细胞。积分值: 复合伤组 > 放射组> 正常对照组> 烧伤组,见表 3

表 3　伤后小鼠基质细胞原位杂交 **TPO mRNA**表达量的变化

Tab 3　Grade and score of TPO mRNA expression in mouse bone marrow stromal cells determined by ISH after injury

Group	Observed cell number											
	G0		G1		G2		G3		G4		Score	
	3d	13d	3d	13d	3d	13d	3d	13d	3d	13d	3d	13d
N	0	1	4	5	7	4	16	17	13	13	2.7	2.9
R	1	1	1	2	14	9	13	14	11	14	2.8	2.95
B	12	10	8	10	12	10	7	8	1	2	1.4	1.55
C	1	0	0	2	8	6	11	13	20	19	3.2	3.3

① Grade: G0 Negative; G1: 1~ 2 positive granules; G2 3~ 4 positive grabykes; G3 5~ 6 positive granules; G4≥ 7 positive granules

② Score: Grade× cell number/40

3　讨论

目前已证实,基质细胞培养上清含有较丰富的 TPO,超过 90%的基质细胞有 TPO mRNA的表达[1,2]。

3.1　放射损伤、烧伤和放烧复合伤对小鼠股骨骨髓巨核细胞数量和外周血血小板数量的影响

TPO的主要生物活性是促进巨核系细胞生长和血小板的成熟和释放[3]。本研究放射、烧伤和放烧复合 3种致伤模型各时相点骨髓巨核细胞和血小板均低于正常组。提示电离辐射和烧伤对巨核系造血表现出明显的抑制作用。电离辐射可对骨髓巨核细胞的核酸、蛋白等生物大分子直接破坏,使相当数量的巨核细胞死亡,存活的细胞功能下调或丧失应有的生成和释放血小板的活性。烧伤创面毒素的吸收,抑制了巨核系造血。同时,烧伤还可引起外周血血小板大量耗损,使血小板数减少。

本研究发现,放烧复合伤表现出了显著加重的复合效应,即巨核细胞和血小板数较放射损伤或烧伤明显减少,提示放烧复合伤可加重机体巨核系造血的损伤。

3.2　放射损伤、烧伤和放烧复合伤对骨髓基质细胞 TPO mRNA的影响

培养 21 d的各致伤组骨髓基质细胞表现出相似的 TPO分泌活性变化趋势,即单纯的电离辐射和烧伤可明显下调基质细胞胞浆内 TPO mRNA量,二者共同作用于机体时,则出现 TPO mRNA明显上调的复合效应。这可能是因复合伤造成培养体系中大部分基质细胞生长抑制或死亡,而使更具抗损伤能力的存活细胞生长而被收集用来提取总 RNA所致。

放烧复合伤组 TPO mRNA高表达而巨核细胞和血小板数减少,还可能与以下因素有关:① TPO广泛的生理来源提示骨髓基质细胞产生的 TPO可能在造血微环境中直接调控血小板的生成但不足以影响其血

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

浆水平的变化[4]。②血小板生成除受TPO的直接促进作用外,还受多种巨核系造血细胞旁路刺激因子的影响[5]。③放射损伤、烧伤和放烧复合伤后基质细胞TPO mRNA量的变化与造血诱导微环境的损伤和血清TPO浓度有一定关系[6,7]。④TPO广泛的生物学作用使其促进血小板生成活性受到限制[8]。

参考文献

1 Guerriero A, Worford L, Holland H K, *et al*. Thrombopoietin is synthesized by bone marrow stromal cells. Blood, 1997, 90(9): 3444

2 Nagahisa H, Nagata Y, Ohnuki Y. Bone marrow stromal cells produce thrombopoietin and stimulate megakaryocyte growth and maturation but suppress proplatelet formation. Blood, 1996, 87(4): 1309

3 Kaushansky K, Lok S, Holly R D. Promotion of megakaryocyte progeniter expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin. Nature, 1994, 369(6481): 568

4 Nomura S, Ogami K, Kawamura K, *et al*. Cellular localization of thrombopoietin mRNA in the liver by *in situ* hybridization. Exp Hematol, 1997, 25(7): 565

5 Gordon M S, Hoffman R. Growth factors affecting thrombocytopoiesis: Potential agents for the treatment of thrombocytopenia. Blood, 1992, 80(2): 302

6 Deutsch V R, Eldor A, Olson T. Stem cells factor (SCF) synergizes with megakaryocyte colony stimulating activity in post-irradiated aplastic plasma in stimulating human megakaryocytopoiesis. Med Oncol, 1996, 13(1): 31

7 Usuki K, Tahara T, Lki S. Serum thrombopoietin level in various hematological diseases. Stem Cells, 1996, 14(5): 558

8 Kaushansky K, Lin N, Grossmann A, *et al*. Thrombopoietin expands eryhroid, granulocyte-macrophage, and megakaryocytic progenitor cells in normal and myelosuppressed mice. Exp Hematol, 1996, 24(2): 265

(收稿: 1998-09-20;修回: 1999-03-16)

(编辑 冷怀明)

Effects of combined radiation-burn injury on thrombopoietin gene expression of bone marrow stromal cells in mice

Huang Hongtao, Luo Chengji, Guo Zhaohua, Zhou Yanhong (Research Institute of Combined Injury, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To determine the effects of combined radiation-burn injury on thrombopoietin (TPO) gene expression of bone marrow stromal cells. Methods: The mice were inflicted with radiation injury in combination with 15% TBSA full-thickness skin burns. The liquid culture of bone marrow stromal cells, RT-PCR and dot blot hybridization were used. Results: The counts of megakaryocytes and platelets were significantly decreased in all the 3 injured groups as compared to the control at the 8th h and remained low for two weeks. TPO mRNA was detected in all the four groups. Either on day 3 or day 13 after the injury, TPO mRNA level in cultured stromal cells from burned mice and irradiated mice were significantly decreased. Conclusion: The bone marrow stromal cells have the ability to produce TPO. This activity is higher in mice with combined radiation-burn injury than in those with simple burns or simple radiation injury.

Key words bone marrow stromal cell; combined radiation-burn injury; gene expression; thrombopoietin; mouse

视网膜巨大囊肿伴视网膜脱离1例

One case of huge retinal cyst with retinal detachment

余 涛* 王 一 (第三军医大学附属西南医院眼科)重庆,400038

1 临床资料

患者,男,27岁,因右眼视力下降1年余,加重伴视物遮挡感2月入院。查体:右眼视力0.05(矫正-7.00 DS→0.2),左眼视力0.2(矫正-7.00 DS→1.0);右眼前节(-),眼底:-6 D见视乳头边界清,色泽淡红,4:00~7:00位视网膜隆起,色泽灰白,最高处+1 D可看清,12:00~5:00位视网膜呈球状隆起,呈幕布样下垂,色泽灰白壁薄,边界清楚,有囊性感,血管爬行其上,最高处+6 D可见,黄斑区呈囊样水肿改变。左眼(-)。

(下转653页)

* 余 涛,女,25岁,住院医师,学士

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