DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.02.002

放烧复合伤骨髓基质细胞某些粘附分子表达的意义*

陈幸华** 罗成基 郭朝华 王 苹 王庆余 刘 林 彭贤贵 曹正怀 (第三军医大学预防医学系防原医学教研室) 重庆, 400038

邓学才 (第三军医大学基础医学部) 重庆, 400038

提 要 目的: 深入探讨放烧复合伤对造血微环境损伤的机制。方法: 采用流式细胞仪观察了 5.0 Gy γ线放射损伤、15% Ⅲ度体表面积烧伤和放烧复合伤小鼠骨髓基质细胞表达血管细胞粘附分子(VCAM-1)、纤维连接素(Fn)、层粘素(Ln)和Ⅳ型胶原(ColⅣ)等细胞外基质成分的变化。结果: 在本实验条件下,随着伤后时间的延长,骨髓基质细胞表达 VCAM-1、Fn、Ln和 ColⅣ的水平具有以单烧组> 正常组> 复合伤组> 单放组的趋势;单烧组具有以伤后 3、7、14 d最高,单放组具有以伤后 3、7 d最低的时效特点。结论: 骨髓微环境基质细胞粘附功能的损伤可能是放烧复合伤造血功能障碍发生的重要机制之一。

关键词 放烧复合伤;骨髓;基质细胞;细胞粘附分子;表达;小鼠

中图法分类号 R818.8

为深入探讨放烧复合伤对造血微环境损伤的机制,本研究观察了 5.0 Gy γ线放射损伤、15% Ⅲ度体表面积烧伤和放烧复合伤小鼠骨髓基质细胞表达血管细胞粘附分子(Vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)、纤维连接素(Fibronectin, Fn)、层粘素(Laminin, Ln)和Ⅳ型胶原(CollagenⅣ, ColⅣ)等细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)成分的变化。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

昆明种健康雄性小鼠共 210只,体重 20~30 g,由本校实验动物中心提供。实验分为 4组:① 单纯放射损伤组(简称单放组, R组): 60只小鼠,用本室 ^{60}Co γ源行一次性全身照射,距离 1.5 m,照射总剂量 5.0 Gy,照射量率 0.4019~0.6646 Gy/min。② 单纯烧伤组(简称单烧组, B组): 45只小鼠,按本室常规方法,致成Ⅲ度烧伤,烧伤体表面积为 15%(病理切片证实)。③ 放射损伤复合烧伤组(简称复合伤组, RB组): 60只小鼠,照射剂量和烧伤面积的方法同上;照射后 30 min内实施烧伤。④ 正常对照组(简称正常组, C组): 45只小鼠。

1.2 骨髓基质细胞培养

按文献[1]的方法。

1.3 流式细胞仪检测

采用间接免疫荧光法,台盼蓝染色判定骨髓基质细胞的成活率为 95%以上。在各样本管中分别加入一抗(VCAM-1、Fn、Ln和 ColⅣ等单抗),终浓度分别为 20 mg/L、20 mg/L、40 mg/L和 40 mg/L;阴性对照用 PBS代替一抗,4℃过夜离心弃上清, PBS洗 3次。分别加 FITC标记的二抗(羊抗鼠 IgG,终浓度为 10 mg/L, 37℃孵育 30 min,离心弃上清, PBS洗 3次,即送流式细胞检测,由仪器配备的软件 LysisⅡ处理后,计算出各检测指标的荧光强度。

1.4 统计学处理

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验。

2 结果

2.1 放烧复合伤对骨髓基质细胞 VCAM-1表达的影响,见表 1

表 1 骨髓基质细胞表达 VCAM-1的变化($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Expression of VCAM-1 on stromal cells cultured *in vitro*($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Control	Days post injury(t/d)					
			1	2	3	7	14	28
B	45	27.32± 1.58	24.37± 1.45*#	36.48± 1.91*#△	47.28± 2.63*#△	56.22± 3.57*#△	38.71± 1.88*#△	29.46± 1.76
R	60	27.32± 1.58	12.26± 0.72*	13.54± 0.82*	8.49± 0.56*	8.64± 0.52*	14.62± 1.08*	20.15± 1.62
RB	60	27.32± 1.58	19.57± 1.26	13.83± 0.95*	11.45± 0.67*	13.56± 0.97*	18.48± 1.42	23.63± 1.38

*: $P < 0.01$ *vs* control; #: $P < 0.01$ *vs* RB; △: $P < 0.01$ *vs* R

* 全军"八五"攻关项目

** 陈幸华,男,40岁,副主任医师,副教授,博士,现在附属新桥医院全军肿瘤中心 重庆, 400037

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

骨髓基质细胞 VCAM-1表达水平,除伤后第 1天单烧组低于正常组外,具有单烧组 > 正常组 > 复合伤组 > 单放组的趋势。伤后不同时相点骨髓基质细胞 VCAM-1表达的变化,单烧组 VCAM-1的表达水平于伤后迅速上升,以伤后第 7天水平最高,至伤后 28 d仍高于正常组、相应的单放组和复合伤组;单放组和复合伤组在伤后各时相点均低于正常组,且以伤后 3 7 d最低,以后逐渐回升,至伤后 28 d仍未达正常组水平。

2.2　放烧复合伤对骨髓基质细胞表达 Fn Ln和 Col Ⅳ的影响,见表 2 3 4

表 2　骨髓基质细胞表达 Fn的变化 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Expression of fibronectin on stromal cells cultured *in vitro* ($\bar{x}\pm s$)

Group	*n*	Control	Days post injury (*t* /d)					
			1	2	3	7	14	28
B	45	41.26± 2.36	38.43± 2.18*#△	36.48± 2.33*△	48.28± 2.71#△	57.33± 2.26*##△	45.91± 2.37#△	43.62± 2.53*△
R	60	41.26± 2.36	20.41± 1.23**	15.47± 1.06**#	10.82± 0.83**##	6.54± 0.45**##	19.71± 1.18**##	25.28± 1.51*
RB	60	41.26± 2.36	18.64± 1.22**	25.31± 1.67*	32.36± 1.78	38.51± 2.15	31.26± 1.53	28.58± 1.72

* : $P < 0.05$,** : $P < 0.01$ *vs* control;# : $P < 0.05$,## : $P < 0.01$ *vs* RB;△: $P < 0.01$ *vs* R

表 3　骨髓基质细胞表达 Ln的变化 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 3　Expression of laminin on stromal cells cultured *in vitro* ($\bar{x}\pm s$)

Group	*n*	Control	Days post injury(*t* /d)					
			1	2	3	7	14	28
B	45	16.32± 1.28	18.63± 1.54	22.55± 1.83	45.17± 2.46**##△	31.78± 2.15**##△	26.16± 1.97##△	22.73± 1.92
R	60	16.32± 1.28	12.24± 0.92	13.18± 1.13	8.62± 0.85*	10.27± 0.95##	12.59± 1.22	14.61± 1.46
RB	60	16.32± 1.28	14.28± 1.16	17.32± 1.35	10.51± 1.07*	12.28± 1.62	14.67± 1.08	15.22± 0.72

* : $P < 0.05$,** : $P < 0.01$ *vs* control;## : $P < 0.01$ *vs* RB;△: $P < 0.01$ *vs* R

表 4　骨髓基质细胞表达 Col Ⅳ的变化 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 4　Expression of collagen Ⅳ on stromal cells cultured *in vitro* ($\bar{x}\pm s$)

Group	*n*	Control	Days post injury(*t* /d)					
			1	2	3	7	14	28
B	45	18.63± 1.15	22.17± 1.78*#△	30.81± 2.27**##△	42.24± 2.58**##△	30.82± 2.13**##△	36.24± 2.35**##△	22.73± 1.68
R	60	18.63± 1.15	12.15± 1.06	10.35± 0.82*	7.28± 0.68**	4.31± 0.27**#	13.15± 0.92	15.61± 1.46
RB	60	18.63± 1.15	13.33± 0.91	12.42± 0.75	9.62± 0.33**	11.35± 0.21*	15.27± 0.58	17.28± 0.72

* : $P < 0.05$,** : $P < 0.01$ *vs* control;## : $P < 0.01$ *vs* RB;△: $P < 0.01$ *vs* R

骨髓基质细胞 Fn表达水平,除单烧组伤后第 1、2天低于正常组和复合伤组伤后第 1天低于单放组以及复合伤组伤后第 3 7天出现波动外,从总体水平来看,随着伤后时间的延长,不同组别骨髓基质细胞表达 Fn、Ln和 ColⅣ的特点和规律与 VCAM-1表达的特点和规律相似,具有单烧组> 正常组 > 复合伤组> 单放组的趋势;单烧组骨髓基质细胞表达 Fn、Ln和 Col Ⅳ的水平具有以伤后 3 7 14 d最高,单放组具有以伤后 3 7 d最低的时效特点。

3　讨论

造血干、祖细胞特异的回髓定位以及造血细胞和基质细胞密切接触和相互粘附作用的基础是由细胞膜上的粘附分子 (CAMs)介导的[2]。大量的研究结果表明, CAMs是一类能介导细胞与细胞、细胞与 ECM间粘附的糖蛋白,它由细胞产生并位于膜上或释放到 ECM中,是造血干、祖细胞回髓定位和信息传递的分子学基础。越来越多的事实表明,某些生物、化学或物理等因素均可通过损伤造血微环境而影响其造血功能[3]。VCAM-1分子最初由美国学者 Harlan于 1985年从人的脐带血管内皮细胞上发现的,这种分子在细胞与细胞间相互识别和粘附的过程中发挥着重要的作用[4]。Hession等[5]对小鼠、大鼠和人的 VCAM-1分子进行了对比研究,发现小鼠和大鼠的 VCAM-1编码的蛋白质序列与人的 VCAM-1编码的蛋白质序列具有较高的同源性,分别为 75.9%和 76.9%,因而可用于对人和动物的基质细胞 VCAM-1表达的研究。Ditlle等[6]观察到,基质细胞在培养状态下达 4月以上或经 2次传代培养 35 d仍具表达 VCAM-1的能力。该作者对 28名经放射疗法和化疗药物预处理后接受骨髓移植的

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

患者进行了研究,结果表明,骨髓移植后21~ 28 d,患者骨髓基质细胞 VCAM-1表达水平以及骨髓基质细胞层支持造血祖细胞生长的能力均低于正常对照组[7]。骨髓基质具有广阔的胞浆和 ECM,后者含 Fn Ln和 ColⅣ,都与造血细胞的粘附有关[8]。本实验的结果表明,随着伤后时间的延长,不同损伤组的骨髓基质细胞表达 VCAM-1的特点和规律与 Fn Ln和 ColⅣ等 ECM成分变化的特点和规律相似:具有以单烧组> 正常组> 复合伤组> 单放组的趋势以及单烧组具有以伤后3 7 14 d最高,单放组以伤后3 7 d最低的时效特点。我室以往对放烧复合伤造血功能障碍时造血实质细胞增长规律的研究结果表明,放射损伤和放烧复合伤以伤后3~ 7 d的骨髓有核细胞和 CFU-GM数量最低;烧伤后3~ 7 d的骨髓有核细胞和 CFU-GM数量最高[9]。与本实验放烧复合伤对骨髓基质细胞粘附分子表达的时效特征和变化规律相吻合。关于放烧复合伤造血功能障碍的造血调控的机制研究,以往主要侧重于对造血实质细胞损伤的观察,而对造血实质细胞赖以生存的造血微环境在放烧复合伤造血障碍中的作用及其机制的研究尚缺乏深入的探讨。本实验的结果提示,在放烧复合伤造血功能的障碍中,骨髓微环境基质细胞粘附功能的损伤可能是放烧复合伤造血功能障碍发生的重要机制之一,进一步深化了对放烧复合伤造血障碍发生机制的认识。

(本课题得到程天民院士和粟永萍教授的重要指教,特此感谢!)

参考文献

1 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集落生成能力的变化.第三军医大学学报,1997;19(3):231

2 Rafii S, Shaprro F, Rimarechin J *et al*. Isolation and characterization of human bone marrow microvascular endothelium cells: hematopoitic progenitor cell adhesion. Blood, 1994;84(1):10

3 Greenberger J S. Toxic effects on the hematopoietic microenvironment. Exp Hematol, 1991;19(4):1101

4 Ditlle B N, Le Bien T W. Redued expression of vascular cell adhesion molecule-1 on bone marrow stromal cells isolated from marrow transplant recipients correlates with a reduced capacity of support human B lymphopoisis *in vitro*. Blood, 1995;86(7):2833

5 Hession C, Moy P, Tizard R *et al*. Cloning of murine and rat vascular cell adhesion molecule-1. Biochemical and Biophysical Reseach Communications, 1992;183(1):163

6 Ditlle B N, Mccarthy J B, Wayner E A *et al*. Regulation of human B-cell precursor adhesion to bone marrow stromal cells by cytokines that exert opposing effect on the expression of vascular cell adhesion molecule-1(VCAM-1). Blood, 1993;81(9):2272

7 Harlan J M. Leukocyte-endothelial interactions. Blood, 1985;65(2):513

8 Deryugina E I, Müller-Sieburg C E. Stromal cells in logn-term cultures: Keys to the elucidation of hematopoietic development? Critical Reviews in Immunology, 1993;13(3):115

9 张克非,罗成基.烧伤及放烧复合伤对造血微环境和粒系造血的影响.中国实验血液学杂志,1993;1(1):87

(收稿:1997-11-25;修回:1998-03-18)

(编辑 仇玉福)

Significance of expression of cell adhesion molecules on bone marrow stromal cells after combined radiation-burn injury in mice

Chen Xinghua, Luo Chengji, Guo Chaohua, Wang Ping, Wang Qingyu, Liu Lin, Peng Xiangui, Cao Zhenghuai, Deng Xuecai (Department of Radiation Medicine, Faculty of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To investigate the mechanism of hematopoietic inductive microenvironment after combined radiation-burn injury. Methods: After the mice were inflicted with simple radiation injury, simple burn injury or combined radiation-burn injury, the expression of cell adhesion molecules including vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), fibronectin (Fn), laminin (Ln) and collagen Ⅳ (ColⅣ) on bone marrow stromal cells cultured *in vitro* was detected with flow cytometry. Results: In the mice, the expression level of the adhesion molecules by the bone marrow stromal cells decreased in order from simple burn injury, control, combined radiation-burn injury to simple radiation injury. Meanwhile, the level is the highest from

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

the 3rd to 14th day in mice with simple burn injury while it is the lowest from the 3rd to 7th day in those with simple radiation injury postinjury. **Conclusion:** The damage of adhesion molecule expression by the bone marrow hematopoietic inductive microenvironment after combined radiation-burn injury may play an important role in occurrence of hematopoietic disorder after the injury.

Key words combined radiation-burn injury; bone marrow; stromal cell; cell adhesion molecule; expression; mouse

急性压力超负荷后大鼠心肌损伤与 ACE基因表达在启动心肌肥大中的意义*

博士生论文摘要

Significance of myocardial damage and ACE gene expression in the initiation of cardiac hypertrophy in rats after acute pressure overload

冯 兵** 陈意生 何作云*** (第三军医大学基础医学部病理学教研室) 重庆, 400038

大量临床和动物实验证实压力超负荷是心肌肥大的独立致病因素,但对于心肌细胞是如何将压力超负荷力学信号转化为细胞内生化信号这一关键信号传递环节至今尚未阐明。近年来提出的心肌局部肾素血管紧张素系统(RAS)概念及其可能参与压力超负荷心肌肥大发生的设想已引起人们相当重视。本研究采用整体动物实验与细胞培养相结合、形态与功能相联系,旨在探讨急性压力超负荷致心肌肥大反应的早期启动机制。这可分为三个方面的问题:① 压力超负荷心肌病理的动态变化、心肌力学的变化特点及二者关系;② 急性压力超负荷是否导致心肌组织内局部 RAS活化, RAS活化是否参与压力超负荷大鼠心肌肥大的发生机制;③ 血管紧张素转换酶(ACE)基因表达的信号机制。主要结果和结论如下:

(1)大鼠腹主动脉部分缩窄术后高血压的发生与腹主动脉缩窄及由此应激引起的血浆内皮素释放增加、一氧化氮含量减少有关。血浆 ACE活性及血管紧张素II 浓度仅在短期内出现暂时性升高,不可能参与腹主动脉部分缩窄术后长时程高血压的发生。

(2)急性压力超负荷大鼠心肌力学出现相对性收缩、舒张功能降低,与心肌需求性缺血缺氧、心肌血管紧张素II 浓度增加抑制心肌有氧能量代谢有关。

(3)急性压力超负荷大鼠早期心肌发生短暂的缺血缺氧性损伤,其形态学改变与心肌力学变化相平行,这种缺氧性损伤可能与早期心肌局部内分泌系统如 RAS激活有关;亚急性期,心肌反应以心肌细胞肥大性及间质增生性改变为主。小剂量卡普托利可减轻心肌缺氧性损伤及部分抑制心肌肥大的发生。提示:急性压力超负荷、心肌缺氧性损伤与心肌 RAS活化存在一定的因果关系,急性压力超负荷是总原因,可同时引起后二者的发生,而心肌缺氧性损伤与心肌局部 RAS活化之间又相互影响,前者可为后者的原因,后者加重前者的变化。

(4)急性压力超负荷大鼠心肌细胞内 ACE mRNA及蛋白表达水平显著升高,与左心室内最大收缩压及左心室重量指数均呈显著正相关。急性压力超负荷大鼠心肌组织 ACE活性及血管紧张素II 含量均明显上升,与 ACE mRNA蛋白表达变化相平行。小剂量卡普托剂可一定程度地抑制压力超负荷心肌血管紧张素II 的含量升高。上述结果提示,压力超负荷可诱导心肌细胞 ACE mRNA及蛋白表达,使 ACE活性升高,血管紧张素II 含量增加。而心肌 RAS活化参与中介了压力超负荷致心肌肥大机制。

(5)急性压力超负荷大鼠心肌组织内皮素含量逐渐升高,较 RAS活化滞后,但其仍与左心室重量指数呈显著正相关,而一氧化氮浓度逐渐降低。小剂量卡普托利可部分抑制心肌一氧化氮的降解,却不影响内皮素释放。提示:急性压力超负荷也促使心肌内皮素等生长因子表达、释放,后者也参与了压力超负荷致心肌肥大反应机制。

(6)急性压力超负荷大鼠心肌内 cAMP浓度升高,与 ACE mRNA及蛋白表达呈显著正相关。体外实验也发现,升高培养心肌细胞内 cAMP浓度,可显著诱导心肌细胞 ACE mRNA及蛋白表达。提示: ACE基因表达与 cAMP信号传递通路有关。

关键词 压力超负荷,急性;心肌,左心室;图像分析;组织化学;免疫组织化学;原位杂交;基因表达,调节;斑点杂交

中图法分类号 R542.2

(收稿: 1998-03-10;修回: 1998-03-18)

(编辑 汪勤俭)

* 国家自然科学基金资助项目, No. 39600041

** 冯 兵,男, 30岁,主治医师,讲师,博士研究生 *** 附属新桥医院心血管内科 重庆, 400037

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