DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.03.015

放烧复合伤骨髓基质细胞对骨髓单个核细胞的粘附能力及 GM-CFU形成的影响*

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、全军复合伤研究所) 重庆, 400038
邓学才 (第三军医大学基础医学部) 重庆, 400038

提 要 目的: 观察放烧复合伤小鼠骨髓基质细胞贴壁层的粘附能力及对 GM-CFU(粒单系造血组细胞集落)形成的影响。方法: 采用细胞粘附实验和细胞粘附阻断实验方法。检测 5 Gyγ线全身照射、15% 体表面积Ⅲ度烧伤和放烧复合伤小鼠骨髓基质细胞粘附的功能。结果: 单烧组伤后第 3~7天显著高于正常组($P<0.05$~0.01); 单放组伤后第 3~7天显著低于正常组($P<0.05$~0.01); 复合伤组伤后第 3天显著低于正常组($P<0.01$); 正常组骨髓基质细胞贴壁层分别加入 VCAM-1、Fn、Ln、ColⅣ等单抗或 VCAM-1单抗分别联合 Fn、Ln和 ColⅣ等单抗处理后, GM-CFU数量均有不同程度的降低。结论: 骨髓微环境基质细胞粘附功能的损伤可能是导致放烧复合伤造血功能障碍的重要原因之一。

关键词 放烧复合伤; 骨髓; 基质细胞; 细胞粘附; 小鼠
中图法分类号 R818.7

为进一步探讨放烧复合伤造血功能障碍发生的机制。本实验观察了 5.0 Gyγ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贴壁层对正常骨髓单个核细胞的粘附能力以及分别或复合应用血管细胞粘附分子(Vascular cell adhesion molecules-1, VCAM-1)、纤维连接素(Fibronectin, Fn)、层粘素(Laminin, Ln)和Ⅳ型胶原(CollagenⅣ, ColⅣ)等单抗对骨髓基质细胞粘附能力的影响。

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 g~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 $^{60}Co\gamma$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(病理切片证实),烧伤体表面积为 15%。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]方法。

1.3 GM-CFU培养

按文献[2]方法。

1.4 细胞粘附实验和细胞粘附阻断实验[3]

1.4.1 细胞粘附实验 取正常小鼠骨髓单个核细胞(5×10^6/ml),用 100 μCi $Na_2{}^{51}CrO_4$共同孵育 30 min,用 10倍体积的 pH 7.4 PBS于 4℃离心洗涤 15 min×3;用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640培养液重悬细胞,调整细胞浓度为 1×10^6/ml。各损伤组和正常组经培养 28 d的骨髓基质细胞贴壁层弃上清。用 RPMI 1640培养液冲洗,加入 1 ml ^{51}Cr标记的骨髓单个核细胞, 37℃孵育 3 h,吸出培养液和未粘附的骨髓有核细胞。PBS洗 5 min×3,用含 0.05% 胰酶和 0.5 mmol/L EDTA消化脱落贴壁细胞并用吸管吹打分散细胞,在倒置显微镜下观察细胞脱落情况。收集粘附细胞悬液,测定其放射性强度(Bq)。计算公式如下:

$$\text{细胞粘附率}(\%)=\frac{\text{粘附细胞液 Bq}}{\text{加入标记细胞液 Bq}}\times 100$$

1.4.2 细胞粘附阻断实验 取正常组和单烧组伤后 3 d并经培养 28 d的骨髓基质细胞贴壁层,弃培养液,用 RPMI 1640培养液洗 3 min×3,各皿分别加入 1 ml抗 VCAM-1(20 μg/ml)、Fn(20 μg/ml)、Ln(40 μg/ml)和 ColⅣ(40 μg/ml)等单抗或联合加入上述相同浓度的单抗,以不加单抗(用 PBS代替)的皿作为阴性对照。37℃孵育 30 min后,弃液,再分别加入 1 ml ^{51}Cr标记的正常鼠骨髓有核细胞(1×10^6/ml), 37℃孵育 30 min,吸出孔内液体,用 PBS洗 5 min×3,经胰酶消化脱落

* 全军"八五"指令性攻关项目
** 陈幸华,男,40岁,副主任医师,副教授,博士,现在附属新桥医院肿瘤中心,重庆, 400037
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

后测定粘附细胞悬液的放射性强度(Bq),计算细胞粘附阻断率,计算公式如下:

$$细胞粘附阻断率(\%)=\frac{未加单抗的粘附细胞液\ Bq-加入单抗的粘附细胞液\ Bq}{未加单抗和粘附细胞液\ Bq}\times 100$$

1.5 实验数据的统计学处理

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 t 检验。

2 结果

2.1 伤后骨髓基质细胞贴壁层对正常骨髓单个核细胞粘附能力的影响,见表1

表1 骨髓基质细胞贴壁层对骨髓单个核细胞的粘附能力($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 The binding rate of bone marrow mononuclear cells to stromal cell adherence layer cultured *in vitro* ($\bar{x}\pm s$)

Group	n	Control	Days post injury (t/d)					
			1	2	3	7	14	28
B	45	26.56±1.52	31.35±1.06	33.71±1.82	39.26±1.18*	42.63±1.84**	30.26±0.75	28.76±0.68
R	60	26.56±1.52	16.23±0.67*##	14.28±1.05**##	10.53±0.57**##	11.85±0.66**##	17.27±0.57##	19.61±0.16
RB	60	26.56±1.52	19.42±1.15	16.86±0.56*##	11.52±0.82**##	15.15±0.36*##	19.58±0.57##	21.26±0.83

*: $P<0.05$,**: $P<0.01$ *vs* Control;#: $P<0.05$,##: $P<0.01$ *vs* B;

单烧组于伤后各时相点均高于正常组,以伤后第3~7天为显著($P<0.05$~0.01);单放组以后第3~7天显著低于正常组($P<0.05$~0.01);复合伤组伤后各时相点均低于正常组,以伤后第3天为著($P<0.01$),各组间比较:单烧组>正常组>复合伤组>单放组,复合伤组和单放组间无显著差别($P>0.05$)。

2.2 正常骨髓基质细胞贴壁层支持 GM-CFU 生长及某些细胞粘附分子单克隆抗体的影响,见表2

表2 细胞粘附分子单抗对 GM-CFU 形成的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Effect of anti-adhesion molecules McAb for GM-CFU growth on stromal cell adherence layer cultured *in vitro* ($\bar{x}\pm s$)

Incubation condition	CFU-GM	Percent inhibition
Without antibodies	128±27	
Anti-VCAM-1	61±12**	52.34
Anti-Fn	86±15*	32.81
Anti-Ln	112±23	12.50
Anti-ColⅣ	118±35	7.81
Anti-VCAM-1+ Anti-Fn	48±15**	62.50
Anti-VCAM-1+ Anti-Ln	71±21**	44.53
Anti-VCAM-1+ Anti-ColⅣ	92±16	28.13

*: $P<0.05$,**: $P<0.01$ *vs* Without antibodies

正常组经培养28 d的骨髓基质细胞层分别用 VCAM-1、Fn、Ln和 ColⅣ单抗处理后,CFU-GM 数量分别降低了52.34%、32.81%、12.50%和7.81%;VCAM-1单抗分别联合 Fn、Ln和 ColⅣ等单抗处理基质细胞贴壁层后,CFU-GM 分别降低了62.50%、44.53%和28.13%。

3 讨论

Dexter型骨髓长期培养体系(Long term bone marrow cultures, LTBMC)是一个被公认的能够模拟体内造血状态的体外造血模型,它的特点是培养中的粘附基质层能够模仿体内造血微环境的多种功能特性,不需增加任何外源生长因子就能支持长期造血[4]。造血干、祖细胞与造血微环境的基质细胞相互粘附,是造血干、祖细胞增殖和分化的前提条件,而这种粘附过程需要造血干祖细胞和基质细胞表达的粘附分子发生特异性识别。当造血干、祖细胞或基质细胞的粘附功能发生一方或双方共同受损时,都将导致骨髓中造血干、祖细胞数量的减少,从而出现造血功能的障碍。结合本实验结果表明,放烧复合伤骨髓基质细胞对骨髓单个核细胞的粘附能力随其伤情的不同,表达的粘附分子水平的高低而变化;采用单抗处理后,可在很大程度上阻断骨髓有核细胞与正常骨髓基质贴壁层的粘附及 GM-CFU 集落生长。骨髓基质细胞表达的 VCAM-1和 Fn对骨髓单个核细胞的粘附起了重要作用,而骨髓基质细胞表达的 Ln和 ColⅣ等 ECM 分子对骨髓单个核细胞的粘附作用较小。Simmons 等[5]采用抗 Integrinα4β1抗体 163H.1R1处理 CD^{+}_{34}细胞或用抗 VCAM-1抗体 6G10处理基质细胞都能使 CD^{+}_{34}细胞和骨髓基质细胞之间的粘附率减少3倍以上。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 d~7 d的骨髓有核细胞和 CFU-GM 数量最低;烧伤后3 d~7 d的骨髓有核细胞和 CFU-GM 数量最高[6,7]。与

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

本实验放烧复合伤骨髓基质细胞贴壁层粘附功能的变化规律相吻合。

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。本研究结果表明,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。

(本课题得到中国工程院院士程天民教授和粟永萍教授的悉心指导,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 陈幸华,罗成基,郭朝华等.放烧复合伤对小鼠骨髓基质细胞动力学及其粘附功能的影响.第三军医大学学报,1997;19(2):97

3 Harinder S J, Frank C S, Sang L *et al*. Vascular cell adhesion molecule-1 and VLA-4 are obligatory adhesion proteins in the heterotypic adherence between human leukemia/lymphoma cells and marrow stromal cells. Exp Hematol, 1993; 21(3): 444

4 Dexter T M, Moore M A S, Sheridan A P C. Maintenance of hemopoietic stem cells and production of differentiated progeny in allogeneic and semiallogeneic bone marrow chimeras *in vitro*. J Exp Med, 1977; 145(9): 1612

5 Simmons P J, Masinovsky B, longenecker B M *et al*. Vascular cell adhesion molecule-1 expressed by bone marrow stromal cells mediates the binding of hemopoietic progenitor cells. Blood, 1992; 80(2): 388

6 罗成基,欧阳子倩主编.核、化学武器损伤防治学.北京:人民军医出版社,1994 38

7 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:1997-12-08;修回:1998-05-25)

(编辑　张大春)

Effects of stromal cells on adherent capacity of mononuclear cells and GM-CFU growth in the bone marrow after combined radiation-burn injury in mice*

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

Abstract **Objective**: To investigate the adherent capacity of mononuclear cells and GM-CFU growth on stromal cell adherence layer in the bone marrow after combined radiation-burn injury using *in vitro* culture. **Methods**: The bone marrow stromal cells extracted from mice inflicted with 5.0 Gy γ ray radiation injury, 15% TBSA full-thickness skin burns and combined radiation-burn injury respectively were cultured and detected with cell adhesion assay and cell adhesion blocking technique. **Results**: The adherent capacity of the mononuclear cells from the mice with simple burns was higher than that from the normal controls and significantly increased at the period from the 3rd to 7th d after injury as compared with those from the normal controls, mice with simple radiation injury and mice with combined radiation-burn injury ($P < 0.05$~0.01). Both of the last two were significantly decrease as compared with that from the normal controls ($P < 0.05$~0.01). After the stromal adhesion layer in the bone marrow from the normal controls was added with such monoclonal antibodies (McAbs) as VCAM-1, Fn, Ln and Col IV respectively or VCAM-1 in combination with Fn, Ln and Col IV respectively, the number of CFU-GM was decreased in various degrees. **Conclusion**: The decrease in adherent capacity of bone marrow hematopoietic indusive microenvironment might be one of the important reasons for hematopoietic disorder after combined radiation-burn injury.

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

* This project was supported by the "Eighth Five" obligatory budget of PLA

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