DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.03.017


# 放烧复合伤小鼠骨髓基质细胞体外成灶能力的变化*

陈幸华** 罗成基 郭朝华 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, 630038

提 要 目的: 观察放烧复合伤小鼠骨髓基质细胞体外集落生成能力的变化。方法: 采用 Dexter型骨髓基质细胞体外培养法,观察 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于伤后 3、7、14 d和经体外培养 14、21、28 d的骨髓基质细胞集落形成能力(CFU-F)的变化。结果:① 单放组和复合伤组均以伤后第 7天最低,至伤后第 14 d仍未达正常组水平($P < 0.01$);单烧组除伤后第 3 d低于正常组外($P < 0.05$),至伤后第 14 d与正常组无显著差异。② 伤后经不同培养时间的 CFU-F动态变化: 在同一规格的培养皿中,正常组和单烧组的骨髓基质细胞均在培养 28 d时形成长满培养皿底的基质细胞层;单放组的骨髓基质细胞至培养 28 d时仍未长满培养皿底;复合伤组的 CFU-F形成能力高于单放组,但逊于正常组和单烧组。结论: 单放组和复合伤组骨髓基质细胞受损后恢复缓慢;放烧复合伤对骨髓基质细胞的损伤具有放射损伤为主的特点。

关键词 辐射损伤;灼伤;放烧复合伤;骨髓;基质细胞;小鼠

中图法分类号 R818.021

放射损伤复合烧伤是核战争和意外核事故条件下发生的主要伤类之一,而造血功能损伤是贯穿放烧复合伤的全过程并在疾病的转归和预后方面起主导作用的因素[1,2]。骨髓基质细胞(Stromal cell)是造血诱导微环境(Hematopoietic inductive microenvironment, HIM)的重要组成成分[3]。关于放烧复合伤造血功能障碍的研究,以往侧重于对造血实质细胞损伤的观察,而对于造血实质细胞赖以生存的造血微环境在放烧复合伤造血功能障碍中的作用及其机理的研究很少。本实验观察了放烧复合伤对小鼠骨髓基质细胞体外成灶能力的影响,为进一步探讨骨髓基质细胞在放烧复合伤造血功能障碍中的作用及其机理奠定实验基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物及分组

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(R组): 60只小鼠,将动物置特制的有机玻璃盒内,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(B组): 45只小鼠,按本室常规方法,即: 根据公式 $S(cm)^2 = 9.13W(G)^{2/3}$ 计算动物总体面积,背部剪毛,以 3%凝固汽油均匀涂布,石棉布遮避非致伤部位,烧 7 s,致成Ⅲ度烧伤(病理切片证实),烧伤面积为 15%。③ 放射损伤复合烧伤组(RB组): 60只小鼠,照射剂量和烧伤伤情同上;照射后 30 min内实施烧伤。所有动物于致伤后立即腹腔注射无菌生理盐水 2 ml,创面不作处理也不作其它治疗,普通饲料,自来水喂养。④ 正常对照组(C组): 45只小鼠。

### 1.2 实验取材方法

采用不同时间致伤同时取材和同时致伤不同时间取材的方法,将每个伤情组每个时相点的一组动物称为一个"实验组"。实验重复 3次,每次实验均设正常对照组。各实验组每次实验实际用于取材的动物数不少于 5只小鼠。

### 1.3 观察时相点

实验小鼠分别于伤后 3、7、14 d行颈椎脱臼活杀,取其骨髓单个核细胞进行基质细胞体外培养 14、21、28 d,检测其伤后不同时间和经不同培养时间的骨髓基质细胞集落数(CFU-F)。

### 1.4 骨髓基质细胞培养

参照 Dexter等[4]介绍的方法。培养体系中含 15%马血清,10%新生小牛血清, $10^{-6}$ M氢化可的松,骨髓有核细胞浓度为 $2\times10^6$/ml,混匀后移入直径为 3.5 cm的皿中,每皿加 2 ml,每观察组各时相点培养 6~ 10皿并重复 3次。培养皿置 37℃ 5% $CO_2$饱合湿度的培养箱中培养。所有培养皿均每周半量换液,连续培养。计数多于 50个非园形细胞所组成的灶数(CFU-F集落),结果以骨髓有核细胞总数和基质细胞产率算出每根股骨产生的基质细胞灶数,以"CFU-F/Femur"表示。

### 1.5 实验数据的统计学处理

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,$t$ 检验求出 $P$ 值。

## 2 结果

### 2.1 伤后骨髓基质细胞(CFU-F)数量的变化见表 1

* 全军"八五"攻关项目

** 陈幸华,男,40岁,副教授、副主任医师,博士,现在附属新桥医院肿瘤中心

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

表1 小鼠股骨骨髓体外培养14d CFU-F的变化 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Changes of mouse bone marrow CFU-F cultured *in vitro* for 14 days ($\bar{x}\pm s$)

| Group | $n$ | postinjury days | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 3 | 7 | 14 |
| C | 45 | 187± 45 | 195± 36 | 172± 43 |
| B | 45 | 105± 17[a,c,f] | 167± 41[d,f] | 181± 37[c,f] |
| R | 60 | 41± 13[b,d] | 8± 3[b,d] | 34± 8[b,d] |
| RB | 60 | 85± 18[b] | 38± 12[b] | 102± 12[b] |

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$ *vs* C; d: $P<0.01$ *vs* RB; e: $P<0.05$, f: $P<0.01$ *vs* R

不同伤类组间比较: 各组骨髓基质细胞经体外培养14 d, 单放组和复合伤组 CFU-F显著低于正常组和单烧组 ($P<0.05$~ $0.01$), 单烧组伤后第3 d低于正常组 ($P<0.5$); 复合伤组高于单放组 ($P<0.01$). 伤后不同时相点比较: 单烧组除伤后3 d显著低于正常组外, 以后逐渐恢复, 至伤后第14天与正常组无显著差异; 单放组和复合伤组于伤后各时相点均显著低于正常组或单烧组, 且均以伤后第7天最低, 至伤后第14天仍未达正常组水平 ($P<0.01$).

2.2 不同培养时间的骨髓CFU-F的动态变化, 见表2

表2 小鼠股骨骨髓 CFU-F的动态变化 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Dynamic changes of mouse bone marrow CFU-F ($\bar{x}\pm s$)

| Group | $n$ | Postinjury days | 14 d of culture | 21 d of culture | 28 d of culture |
|---|---|---|---|---|---|
| C | 45 | | 185± 41 | +++ | FC |
| B | 15 | 3 | 105± 17[a,c,f] | +++ | FC |
| | 15 | 7 | 167± 41[d,f] | +++ | FC |
| | 15 | 14 | 181± 37[c,f] | +++ | FC |
| R | 20 | 3 | 41± 13[b,d] | + | UC |
| | 20 | 7 | 8± 3[b,d] | + | UC |
| | 20 | 14 | 34± 8[b,d] | + | UC |
| RB | 20 | 3 | 85± 18[b] | ++ | UC |
| | 20 | 7 | 38± 12[b] | ++ | UC |
| | 20 | 14 | 102± 12[b] | ++ | UC |

+: small group like growth; ++: approch large group like growth; +++ large group like growth; FC: Fully conflaent growth; UC: Unfully confluent growth; a: $P<0.05$, b: $P<0.01$ *vs* C; c: $P<0.05$, d: $P<0.01$ *vs* RB; e: $P<0.05$, f: $P<0.01$ *vs* R

各损伤组于伤后不同时相点分别进行14 d, 21 d和28 d培养的 CFU-F的动态变化结果表明: 在同一规格的培养皿中, 正常组和单烧组的骨髓基质细胞均在培养21 d出现较集落更大但难以计数的团片样生长状态, 并在培养28 d时形成长满培养皿底的基质细胞层; 单放组在伤后第3天和第7天经培养14 d, 只有少量 CFU-F形成, 经培养21 d时出现较正常组和单烧组小的团片样骨髓基质细胞生长, 至培养28 d时仍未长满养皿底; 复合伤组的 CFU-F形成能力优于单放组, 但逊于正常组和单烧组; 至伤后第14天经培养28 d的复合伤组基质细胞数量恢复较快, 但仍未达正常组的水平.

## 3 讨论

采用放射手段辅助治疗恶性肿瘤及骨髓移植前的预处理是临床常规工作, 而造血功能损伤是放射损伤和放烧复合伤的主要并发症之一. 造血干细胞对造血微环境特异的定位以及造血干细胞和基质细胞的密切接触是造血干细胞发生增殖、分化的前提和基础[5].

单纯放射损伤对骨髓基质细胞的影响已有大量的研究报道, 但结论不尽一致. 一种观点认为, 骨髓基质细胞具有较高的抗放能力, 如体外培养的基质细胞层经40 Gy γ线照射后不影响其集落刺激因子生成; 经100 Gy γ线照射后仍保持其重要的粘附结构缝隙连接 (Gap junctions)[6]. 国内的研究结果表明, 骨髓基质细胞具有较高的辐射敏感性, 引起轻度骨髓型急性放射病的γ线照射剂量即可引起造血微环境的功能缺陷; 随着照射剂量的增大, 造血微环境损伤与放射病造血功能障碍的严重程度呈明显的量效关系[7]. 不同的实验条件所得的结果不同, 前者为对体外照射经培养后形成的骨髓基质细胞的观察; 后者为对活体动物照射后骨髓基质细胞辐射效应的研究. 造血微环境的辐射敏感性虽低于造血干细胞, 但造血微环境的辐射损伤较持久; 这种损伤或明显影响造血功能的恢复过程, 或潜隐存在, 当骨髓再度损伤时将影响造血重建的速度, 甚至成为长期性或永久性骨髓再生低下的因素[8]. 本实验结果表明: 单放组和复合伤组 CFU-F显著低

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

于正常组( $P < 0.01$);单烧组除伤后第 3天低于正常组外( $P < 0.05$),以后逐渐恢复,至伤后第 14天与正常组无显著差异单放组和复合伤组于伤后各时相点均显著低于正常组和单烧组;且均以伤后第 7天最低,至伤后第 14天仍未达正常组水平( $P < 0.01$)。对伤后经不同培养时间的 CFU-F动态变化的情况来看:正常组和单烧组的骨髓基质细胞均在培养 21 d出现较集落理更大但难以计数的团片样生长状态,并在培养 28 d时形成长满培养皿底的基质细胞层;单放组在伤后第 3天和第 7天经培养 14 d,只有少量 CFU-F形成,经培养 21 d时出现较正常组和单烧组小的团片样骨髓基质细胞生长,至培养 28 d时仍未长满培养皿底;复合伤组的 CFU-F形成能力优于单放组,但逊于正常组和单烧组;至伤后第 14天经培养 28 d的复合伤组的基质细胞数量恢复较快,但仍未达正常组的水平。对于放烧复合伤骨髓基质细胞在体外培养条件下生长的动态变化,虽然缺乏其他作者的对比研究,但综合本实验关于伤后不同时间 CFU-F成灶能力和对伤后不同培养时间的 CFU-F动态变化的观察结果可以看出,骨髓基质细胞 CFU-F成灶能力具有正常组> 单烧组> 复合伤组> 单放组以及单放组和复合伤组骨髓基质细胞 CFU-F数以伤后 7 d最低的特点和规律;单放组和复合伤组骨髓基质细胞受损伤后恢复缓慢;放烧复合伤对骨髓基质细胞的损伤具有放射损伤为主的特点。

## 参考文献


1 程天民 主编.防原医学.上海:上海科学技术出版社, 1986: 446~ 456

2 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~ 78

3 Deryugina E I, Müller-Sieburg C E. Stromal cells in long-term cultures: Keys to the elucidation of hematopoietc development? Crit Rev Immunol, 1993; 13(2): 115

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(5): 1612

5 Wilkins B S, Jones D B. Vascular networks within the stroma of human long term bone marrow cultures. J Pathol, 1995; 177(3): 295

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

7 陈幸华,罗成基,郭朝华等. 5.0 Gy放射损伤对小鼠骨髓基质细胞周期及其 DNA含量的影响.第三军医大学学报, 1996; 18(3): 209

8 陈家佩,刘秀英.骨髓基质细胞的幅射效应及其临床意义.中国应用生理杂志, 1988; 4(4): 336


(收稿: 1996-12-27;修回: 1997-04-20)

(编辑　张大春)

# Changes of cultured mouse bone marrow stromal cells after combined radiation-burn injury

Chen Xinghua, Luo Chengji, Guo Chaohua, Wang Qingyu, Liu Lin, Peng Xiangui, Cao Zhenghuai (Department of Radiation Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

**Abstract** Objective: To investigate the changes of cultured bone marrow stromal cells after combined radiation-burn injury in mice. Methods: Mice were inflicted with radiation injury by 5.0 Gy $^{\gamma}$ ray radiation, burns of 15% TBSA full-thickness skin and combined radiation-burn injury respectively to observe the changes of cultured bone marrow stromal cells. Results: The number of CFU-F cultured *in vitro* with Dexter's method from mice treated with 15% TBSA full- thickness skin burns was significantly decreased compared with that of the controls on the 3rd day after injury ( $P < 0.05$), there was no statistical significance compared with that of the controls on the 14th day after injury. However, the number of CFU-F from the mice with radiation and combined radiation-burn injury was significantly decreased compared with those of the controls and those with 15% TBSA full-thickness skin burns ( $P < 0.05$~ 0.01). The number of CFU-F reaching the lowest level on the 7th day after injury in mice with radiation injury and those with combined radiation-burn injury still did not reach the level of the controls on the 14th day after injury ( $P < 0.05$). The number of CFU-F of the mice with combined radiation-burn injury was significantly higher than that of the mice with radiation injury. Conclusion: Radiation injury and combined radiation- burn injury sustain for a long time and the latter exerts injurious effects on bone marrow stromal cells in a similar way as the former.

**Key words** radiation injury; burns; combined radiation-burn injury; bone marrow; stromal cell; mouse.

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