DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.03.018

肿瘤坏死因子-α 对放烧复合伤粒-单系造血作用的实验研究

蒋 伟* 罗成基 (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: 探索重组人肿瘤坏死因子-α(TNF-α)对小鼠放烧复合伤后粒-单系造血的调控作用以及烧伤、放射损伤对造血损伤的复合效应。方法: 采用小鼠骨髓粒-单系祖细胞体外琼脂培养技术。结果: TNF-α对正常小鼠粒-单系造血表现出明显的抑制作用,且呈剂量依赖性。结论: TNF-α在体外培养体系中对放射损伤、烧伤及放烧复合伤粒-单系造血具有强烈的抑制作用,在体内则表现出一定的刺激作用。复合伤组介于两单伤组之间。

关键词 肿瘤坏死因子-α;粒-单系造血;辐射损伤;灼伤;放烧复合伤

中图法分类号 730.021

放射损伤及合并烧伤的放烧复合伤是战时核爆炸与平时核事故所发生的主要伤类,其所致的造血损伤是最主要的病理改变之一,造血功能的恢复情况是预后的关键因素。肿瘤坏死因子-α(TNF-α)对造血系统具有多种作用,但国内文献较少报道。笔者使用重组人(TNF-α),系用骨髓单粒系祖细胞(CFU-GM)体外琼脂培养技术研究了 TNF-α 在体内外对放烧复合伤小鼠粒系造血的作用,藉以探索 TNF-α 对造血调控的规律,以及烧伤和放射损伤的复合效应,为复合伤的救治提供依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选用健康雄性昆明种小鼠,7~8周龄,体重 20 g~40 g

1.2 分组

设立正常对照组(N);放射损伤组(R):采用^{60}Coγ射线全身一次性照射,剂量率(26.80~30.53)cGy/min,照射剂量 6.0 Gy;烧伤组(B):使用 3% 凝固汽油在剪毛后的小鼠背部制成 15% Ⅲ度烧伤(病理切片证实);放烧复合伤组(C):将照后的小鼠在伤后 30 min内致以 15% Ⅲ度烧伤。所有动物均于致伤后立即腹腔注射无菌生理盐水 2ml,创面不予任何处理,也未作其它治疗。

1.3 重组人 TNF-α

由第三军医大学野战外科研究所生产,其活性为 3.44×10^7 U/mg

1.4 小鼠肌条件培养液(MMCM)的制备

根据葛忠良等[1]的方法制备。

1.5 CFU-GM 培养

将每组各 10只小鼠分别于伤后 1、3、5、7 d断颈活杀,用 RPMI-1640液冲洗双侧股骨,制成单细胞悬液,进行体外培养。体系由马血清 2.0 ml, RPMI-1640 4.4 ml, MMCM 0.8 ml, 3% 琼脂 0.4 ml及细胞浓度为 1.0×10^5/ml的小鼠骨髓有核细胞组成,置于 5% CO_2, 37℃饱和湿度下培养,7 d后于倒置显微镜下计数大于 50个细胞的集落为一个 CFU-GM。

1.6 统计分析

采用 χ^2检验,单因素方差分析,相关系数及显著性检验方法进行统计学处理。

2 结果

2.1 TNF-α 对正常小鼠骨髓细胞体外培养 CFU-GM 产率的影响

在培养体系中加入 5 U/ml TNF-α 即能明显抑制 CFU-GM生长,随 TNF-α 浓度增大,这种抑制作用更加强烈,表现出明显的剂量依赖性。

2.2 不同伤情下骨髓细胞 CFU-GM 的数量变化

在观察时相点,放射损伤组 CFU-GM 明显受到抑制,而烧伤组在伤后 1、3 d表现为一定的刺激作用,复合伤组介于两单伤组之间,其变化规律与放射损伤组一致,见图 1。

2.3 TNF-α 对复合伤小鼠 CFU-GM 的体外抑制作用

在体外培养体系中加入 10 U/ml的 TNF-α,所观察时相点内对各伤情组 CFU-GM 的产率均表现为显著的抑制作用,且以伤后第 1天最强,不同伤情组间抑制程度比较显示: R> C> B,见图 2。

* 蒋 伟 男,28岁,实习研究员,硕士,现在中华创伤杂志编辑部,重庆,630042

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

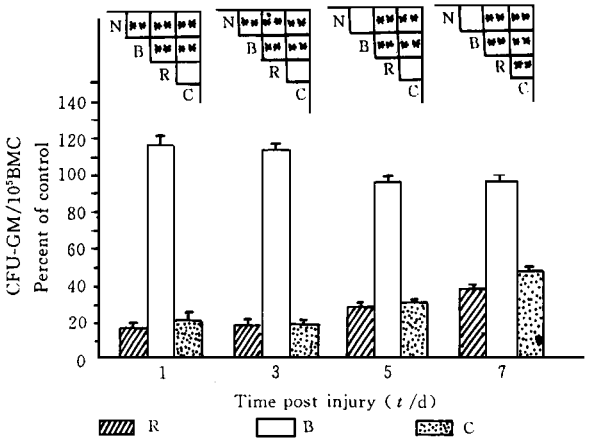


图 1　不同损伤对 CFU-GM的影响 (*n*= 10)

Fig 1　The effects of different injuries on CFU-GM (*n*= 10)

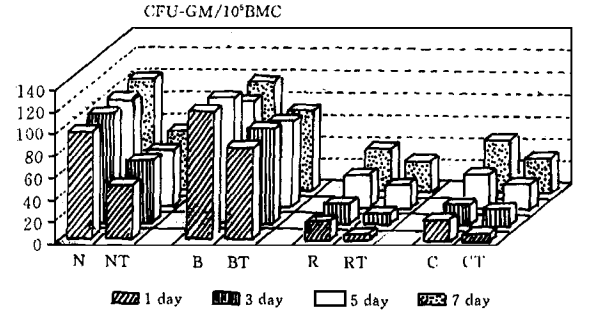


图 2　TNF-α 对体外 CFU-GM的抑制作用 (*n*= 10)

Fig 2　The inhibitory effect of TNF-α on CFU-GM *in vitro* (*n*= 10)

2.4　TNF-α 对复合伤小鼠 CFU-GM的体内刺激作用见图 3

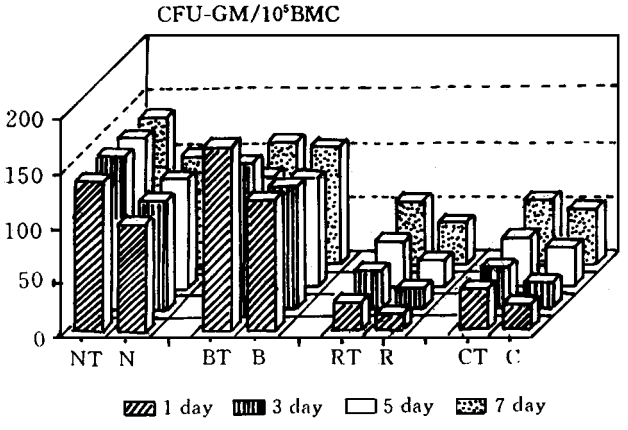


图 3　TNF-α 对体内 CFU-GM和刺激作用 (*n*= 10)

Fig 3　The stimulating effect of TNF-α on CFU-GM *in vivo* (*n*= 10)

各组动物于致伤后立即腹腔注射 1.0× 10^5 U/只 TNF-α 对各种伤情下 CFU-GM 产率均表现出一定的刺激作用,这种刺激作用在第3天时达峰值,不同伤情组间比较结果为: R> C> B

3　讨论

TNF-α 在体外对正常小鼠粒系造血祖细胞表现出强烈的抑制活性,且随给药剂量增大,这种抑制作用更为显著,统计分析表明 TNF-α 的剂量与其对 CFU-GM 产率的抑制作用具有明显的相关性。Beran等[2]研究发现 TNF-α 与骨髓细胞作用 2 h需较大剂量 (1.0× 10^4 ng/ml)才能抑制 CFU-GM 生长,而作用时间延长至 16 h只需小剂量 (10 ng/ml)就可出现抑制效应,表明 TNF-α 在体外对 CFU-GM的抑制作用具有时间依赖性。这种剂量和时间的依赖性提示 TNF-α 对 CFU-GM的抑制作用是一种抗增生效应而非直接的细胞毒作用。Johnson等[3]把 1.0× 10^4 U TNF-α 经尾静脉注入小鼠体内,发现 TNF-α 能促进小鼠骨髓 BFU-E CFU-GM生长,而抑制 CFU-E生长,表明 TNF-α 对造血功能的影响在体外和体内是不一致的。目前多数学者认为其机理在于 TNF-α 在体内激活了造血因子网络系统,诱导了多种集落刺激活性 (CSFs)的产生,如 TNF-α 能诱导 GM-CSF G-CSF 和 IL-1等的产生[4]。这种诱导作用机理目前多认为发生在转录水平[5]。Sten等[6]在研究 TNF对造血祖细胞调节作用机理时发现 TNF是造血祖细胞增殖的多向调节因子,其对小鼠骨髓细胞的直接作用为抑制,这种作用与其能对造血细胞集落刺激因子受体 (CSF-R)下调的能力有关,而 TNF间接地刺激骨髓集落的形成至少部分是通过诱导了 CSFs的产生。TNF对造血细胞 CSF-R 的调节可能取决于 TNF的浓度和环境中其它造血生长因子的协同或制约,各因子之间的相互作用扩大了 TNF-α 效应的潜能和复杂性。

对不同伤情下粒系祖细胞体外培养结果 (图 2)表明烧伤早期对 CFU-GM 具有一定的促进作用,这可能与烧伤后细菌感染通过 LPS刺激-单个核细胞产生 CSFs,后者再激活 CFU-GM 增殖分化有关[7]。放烧复合伤组造血损伤程度介于两单伤之间,更多地具有放射损伤的特点,但其恢复较快,这可能与烧伤创面感染刺激机体产生细胞因子有关。本实验观察了在体内外 TNF-α 对放烧复合伤小鼠粒系造血的作用。在体外,

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

TNF-α 在观察时相点内对不同致伤小鼠 CFU-GM 生长均表现为抑制作用,说明 TNF-α 对各种伤情下粒系造血的直接作用是一种抑制作用,而不同伤情组间比较,这种抑制表现出 R> C> B的特点,放射损伤对粒系造血具有强烈的抑制作用,而烧伤的热力损伤及合并感染能刺激细胞产生体液因素,在烧伤早期刺激了粒系造血,骨髓造血功能活跃,因而对 TNF-α 的抑制作用不及正常组敏感,放射损伤复合烧伤后粒系造血的变化主要与放射损伤规律一致,但又具有烧伤的某些特点,TNF-α 对其抑制程度介于两单伤组之间。在体内,TNF-α 对正常及各种伤情下粒系造血表现出一定的刺激作用。放射损伤后体内造血损伤严重,由于外源性 TNF-α 的大剂量给入,启动了体内造血因子网络系统,诱导造血生长因子的产生与分泌,通过 TNF-α 与其所诱生的造血生长因子协同对骨髓细胞受体后水平的调节,加速了造血的恢复。放射损伤复合烧伤后对 TNF-α 的反应与放射损伤组的变化规律相似,从增长率看,R> C> B 不同致伤因素对粒系造血的抑制作用表明: R> C> B 可以看出在体内造血损伤越严重,对 TNF-α 间接的刺激作用越敏感。目前对放烧-复合伤的造血调控未见文献报道。复合伤造血调控的规律尚待进一步的研究。

参考文献

1 葛忠良,刘秀英,刘雪桐.来源于横纹肌的造血灶刺激因子.军事医学院院刊,1980;3(4):234

2 Beran M, O'Brien S, Gutterman J U *et al*. Tumor necrosis factor and human hematopoisis: I. Kinetics and diversity of hmuan marrow cell reponse to recombinant tumor necrosis factor alpha in short-term suspension cultures *in vitro*. Hematol Pahol, 1988; 2(1): 31

3 Johnson C S, Chang M J, Furmanski P. *In vivo* hematopoietic effects of tumor necrosis factor alpha in normal and erythroleukemia: Characterization and therapeutic applications. Blood, 1988; 72(5): 1875

4 Zucali J J R, Broxmeyer H E, Gooss M A *et al*. Recombinant human tumor necrosis factor α and β stimulate fibroblasts to produce hematopoietic growth factors *in vitro*. J Immunol, 1988; 140(3): 840

5 Oster J W, Lindemann A, Horn S *et al*. Tumor necrosis factor-alpha but not TNF-beta induces secretion of colony-stimulating factor for macrophages (CSF-1) by human monocytes. Blood, 1987; 70(6): 1700

6 Sten E, Jacobsen W, Ruscetti F W *et al*. Tumor necrosis factor α directly and indirectly regulates hematopoietic progenitor cell proliferation: Role of colony-stmulating factor receptor modulation. J Exp Med, 1992; 175(3): 1759

7 Robinson W A, Entringer M A, Bolin R W *et al*. Bacterial stimulation and granulocyte inhibition of granulopoietic factor production. N Engl J Med, 1977; 297(2): 1129

(收稿: 1996-12-10;修回: 1997-04-21)

(编辑 张大春)

Regulative effects of tumor necrosis factor α on granulocyto- monocytopoiesis after combined radiation-burn injury in mice

Jiang Wei, Luo Chengji (Department of Radiation Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract **Objective**: To explore the regulative effects of recombined human tumor necrosis factor α (TNF-α) on granulocyto- monocytopoiesis and the combined effects of burn and radiation injury on hematopoiesis in mice. **Methods**: Semisolid agar colony assay of CFU-GM was used. **Results**: TNF-α significantly inhibited CFU-GM of normal mice *in vitro* in a dose-dependent manner. **Conclusion**: TNF-α exhibits strong inhibitory effects on CFU-GM in agar culture system and stimulating effects on it *in vivo*.

Key words tumor necrosis factor α; granulocyto-monocytopoiesis; radiation injury; burns; combined radiation-burn injury; mouse.

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