DOI:10.16016/j.1000-5404.1996.03.010

5.0 Gy放射损伤对小鼠早期骨髓造血基质细胞周期及其DNA含量的影响*

陈幸华 罗成基 郭朝华 王庆余 刘 林 彭贤贵 (第三军医大学预防医学系防原医学教研室)重庆,630038
陈兆珍 李才安 (第三军医大学基础部中心试验室)重庆,630038

提 要 取5.0 Gy γ射线照射后3 d和7 d的小鼠骨髓体外液体培养14 d和21 d,显示骨髓基质细胞仍能贴壁生长,但骨髓基质细胞集落(CFU-F)数量显著低于正常。照后7 d的CFU-F数量虽比照后3 d的CFU-F数量有所增加,但恢复缓慢;延长培养时间,显示照射鼠的骨髓基质细胞增殖受抑。流式细胞仪检测结果表明G_2+M期细胞和DNA含量显著低于正常对照组;随着照后时间的延长,S、G_2+M期含量有所恢复,但仍显著低于正常对照组。说明骨髓造血基质细胞具有较高的辐射敏感性且对辐射损伤持续较久。

关键词 骨髓基质细胞;放射损伤;细胞周期;DNA含量
中图法分类号 R818.83;R551.3

造血微环境是造血干/祖细胞定居、增殖、分化、发育和成熟的场所,造血基质细胞是造血微环境的重要组成部分,造血微环境的异常是造血功能障碍的重要影响因素。关于造血基质细胞的辐射敏感性问题,各家意见不一[1,2]。进一步探讨这个问题,有助于深化对核爆炸、意外核事故或临床放射治疗条件下导致的造血功能障碍的认识并指导对其采取科学的诊治。为此,本实验观察了放射损伤对骨髓造血基质细胞的细胞周期及DNA含量的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

本校动物所繁殖的昆明种健康小白鼠:共60只,雄性,体重25~30 g。随机分为二组:①放射损伤组(R):30只小鼠,用^{60}Co-γ照射5.0 Gy,距离4 m,照射率1.27 Gy/min;②正常对照组(N):30只小鼠。

1.2 观察时相点

取放射损伤后3、7 d小鼠骨髓细胞进行体外培养,分别对培养14、21 d的骨髓基质细胞进行检测。

1.3 骨髓基质细胞培养

小鼠股骨髓细胞以含10%新生小牛血清,15%健康马血清,青、链霉素各100 U/ml、10^{-6} mol/L氢化可的松液和RPMI-1640培养液制备成2.0×10^6/ml浓度,混匀后接种2 ml/皿,置37℃、5%的CO_2培养箱内孵育。每周半量换液,同时观察经培养后14、21 d贴壁细胞层的生长情况并作骨髓基质细胞集落(CFU-F)计数。

1.4 流式细胞术测定

对培养14、21 d的骨髓基质细胞经0.25 mg%胰酶消化、洗涤,制成单细胞悬液。用70%冷乙醇固定,测定前用PBS液洗涤去除乙醇后,加RNA酶5 mg/ml,37℃温育后,放入冰浴内中止酶的作用。用碘化丙啶(PI)50 μg/ml染色,经尼龙网过滤后用美国Becton Dickinson公司产FACStarplus流式细胞仪分析。测定前用戊二醛固定的鸡红细胞调节仪器,使仪器*CV*值稳定在4%以下,每个样品收集10 000个细胞,用仪器配备的软件CellFit(Version 2.01.2)处理分析后计算出细胞周期G_0/G_1、S和G_2+M期的百分比和细胞的DNA总含量。

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 放射损伤后骨髓基质细胞CFU-F数量随照射后不同时间和培养时间的不同而变化(见表1)

表1 5.0 Gy照射后骨髓基质细胞集落数量的变化($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Changes of bone marrow CFU-F after 5.0 Gy radiation ($\bar{x}\pm s$)

Group	*n*	Days after radiation	14 d of culture	21 d of culture
N	30		183±28	grow confluently
R	15	3	13± 5**	11± 3
	15	7	27±17**	20±12

**: $P<0.01$ *vs* N

5.0 Gy照射后,骨髓基质细胞仍能贴壁生长,但CFU-F数量显著低于正常。照后7 d的CFU-F数量虽比照后3 d的CFU-F数量有所增加,但恢复缓慢;与培养14 d的CFU-F相比,随着培养时间的延长,逐渐显示出受照鼠骨髓基质细胞增殖的抑制,在光镜下可见一些结构模糊的变性退变细胞。

* 全军"八五"攻关项目

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

2.2 放射损伤后骨髓基质细胞的细胞周期和DNA含量的变化

放射损伤组的G_0+G_1期细胞显著高于正常对照组，G_2+M期细胞和DNA含量均显著低于正常对照组；随着照后时间的延长，S、G_2+M期细胞和DNA含量虽有所恢复，但仍显著低于正常对照组(见表2)。

表2 5.0 Gy照射后骨髓基质细胞的细胞周期和DNA含量的变化($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Changes of cell cycle and DNA content in stromal cells after 5.0 Gy radiation ($\bar{x}\pm s$)

Group	n	Days after radiation	G_0+G_1	S	G_2+M	DNA
N	30		68.30±1.85	19.10±1.23	12.60±0.75	78.57±0.83
R	15	3	81.60±1.13*	15.90±0.86	2.60±0.41**	58.40±0.79*
	15	7	78.30±1.64*	17.50±1.39	4.20±1.27**	61.17±1.35*

*：$P<0.05$ *vs* N，**：$P<0.01$ *vs* N

3 讨论

有人认为，构成造血微环境的基质细胞成份在生理状态下几乎不生长，均处于G_0期，对体外培养的基质细胞层以10 000c Gy γ线照射仍保持其重要的粘附结构-缝隙连接(Gap junction)[1]。国内的研究结果表明，引起轻度骨髓型急性放射病的射线剂量即可引起造血微环境的功能缺陷，使骨髓基质细胞贴壁生长受抑，成灶减少以及支持GM-CFU-C生长的作用减弱、丧失甚至出现抑制性影响；放射损伤后骨髓基质细胞复正时间缓慢[2]。本研究观察到5.0 Gy照射后，骨髓基质细胞仍能贴壁生长，但CFU-F数量显著低于正常。照后7 d的CFU-F数量虽比照后3 d的CFU-F数量有所增加，但恢复缓慢；与培养14 d的CFU-F相比，随着培养时间和延长，逐渐显示出受照鼠骨髓基质细胞增殖的抑制，在光镜下可见一些结构模糊的变性退变细胞。与文献[2]报道的结果相近。说明骨髓造血基质细胞具有较高的辐射敏感性。

细胞的DNA合成和有丝分裂是细胞增殖的两个标志，在细胞周期中，从G_1期→S期，G_2期→M期这两个阶段正处于复杂活跃的分子水平变化时期，易受外界条件的影响且DNA是辐射作用的靶分子[3]。在本实验中，5.0 Gy照射小鼠的骨髓基质细胞的G_0+G_1期细胞显著高于正常对照组，而反应细胞增殖状态的G_2+M期细胞和DNA含量显著低于正常对照组；随着照后时间的延长，G_2+M期细胞和DNA含量虽有所恢复，但仍显著低于正常对照组，表明放射损伤使基质细胞的细胞周期产生了"G_1期阻滞"，即抑制了细胞从G_1期进入S期，使DNA合成的细胞少，进而使DNA合成的后期细胞(G_2期细胞)和有丝分裂期细胞(M期细胞)减少；同时，由于射线对DNA的直接损伤作用，使骨髓基质细胞DNA含量减少，表明骨髓造血基质细胞的辐射敏感性具有其物质基础。这与我们以往对骨髓造血实质细胞的研究结果相符[4]，并进一步阐明了放射损伤导致的骨髓造血功能障碍是辐射对造血实质细胞和造血微环境共同损伤的结果。因此，在临床上对肿瘤进行放射治疗时或在骨髓移植前进行照射预处理时，应谨慎选择射线剂量，使之既能达到尽可能杀灭癌细胞，又能确保造血微环境不发生严重永久性损伤而影响造血功能的自我重建或移植后重建。

参考文献

1 Simmons PJ, Gronthos S, Ohta S *et al*. Human bone marrow stromal cell precursors: identification and developmental potential. Bone Marrow Transplantation, 1995; 15(1): S3

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

3 Vladimirov VG, Belokhvostov AS, Sherlina SS. Extracellular DNA level in the blood of irradiated rats. Int J Radiat Biol, 1992; 62: 667

4 罗成基，魏 文，曾昭铸等. 放烧复合伤对骨髓及脾脏细胞周期、DNA及蛋白质含量的影响. 实验血液学杂志，1995; 3(1): 96

(收稿：1995-10-12；修回：1996-05-10)

(编辑 刘 鹏)

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

Changes of cell cycle and DNA content in bone marrow stromal cells after radiation injury in mice

Cheng Xinghua, Luo Chengji, Guo Chaohua, Wang Qingyu, Liu Lin, Peng Xiangui (Department of Radiation Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)
Chen Zhaozhen, Li Caian (Department of Elementary Education, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract The changes of CFU-F, cell cycle and DNA content of the bone marrow stromal cells were observed in mice 3 and 7 d after the animals were irradiated with 5.0 Gy gamma rays from a ^{60}Co sourse. The samples of bone marrow were cultrued for 14 and 21 d and examined with FACS can flow cytometry using Lysis II software. It was found that the bone marrow stromal cells could still grow and adhere to the wall of the cultrue bottle but the number of CFU-F was significantly decreased. The number of CFU-F was increased in certain extent on the 7th day after irradiation but the recovery was rather sluggish. Prolongation of the culture time revealed that the proliferation of the irradiated bone marrow stromal cells was suppressed. Flow cytometric examination revealed that G_2+M cell ratio and DNA content of the irradiated bone marrow stromal cells were significantly lower than those of the normal control. When the culture was prolonged, the S cell ratio, G_2+M cell ratio and DNA content were gradually increased but they were still lower than those of the normal control. These findings indicate that hematopoiesis of bone marrow stromal cells is especially sensitive to radiation injury and takes a long time to restore its normal level.

Key words stromal cells; bone marrow; radiation injury; cell cycle; DNA content; mouse

青光眼自发性角膜破裂一例

Report of a case of spontaneous rupture of cornea with glaucoma

何春燕 王 一 (第三军医大学附属西南医院眼科) 重庆,630038

1 病例介绍

患者,女,69岁。因"头痛、左眼胀1 h,左眼球出血及内容物脱出30 min"入院。患者左眼为青光眼绝对期3月。既往有冠心病史。

查体:生命体征平稳。心率38～42 次/min。眼部检查:左眼无光感,眼睑肿胀,结膜充血水肿。角膜混浊,中央破裂,眼内容物及血凝块嵌顿于裂口中,将裂口挣开6 mm×7 mm,眼压T_{-2}。眼内结构窥视不清。心电图示Ⅰ度房室传导阻滞。胸透未见异常。

于1995年1月16日由心内科协助安置体外临时起搏器后,在心电监护下施行了"左眼球摘除术"。病人术后康复出院。摘除的眼球送病理检查,其报告为:镜检见角膜破裂,裂口不规则,裂口及眼内充满大量出血组织。脉络膜、视网膜脱落。视神经萎缩。考虑左眼球外伤性破裂。

2 讨论

青光眼绝对期时,巩膜出现葡萄肿,严重时在外力影响下可发生眼球破裂[1]。巩膜葡萄肿常见于:①前葡萄肿:可分为睫状体葡萄肿和间插葡萄肿,位于睫状体附近。②赤道部葡萄肿:发生于涡静脉穿出巩膜处。③后葡萄肿:常见于视神经乳头周围及后极部。前两种多见于慢性充血性青光眼和绝对期青光眼,后一种多为高度近视眼[2]。本例病人1994年7月因"左眼胀,视力下降"在我院门诊就诊,诊断为"左眼慢性闭角性青光眼(近绝对期)"。眼压:右眼1.36 kPa,左眼9.21 kPa。予降眼压药物治疗无效。10月左眼失明。以后仅在左眼胀时点降眼压药物治疗。门诊检查从未发现左眼角膜葡萄肿、角膜外伤及其他病理改变。也未见有巩膜葡萄肿。但患者眼压一直偏高。在这种情况下,左眼角膜发生自发性破裂,实属罕见,迄今未见文献报道。在长期高眼压作用下,角膜水肿,板层间隙扩大,固定细胞变性,抵抗力减弱。当眼压增高达一定程度时,则在角膜最薄弱的中央发生破裂。该病例说明青光眼眼球破裂不仅见于角膜巩膜葡萄肿处,也可见于无外因的角膜自发性破裂。

关键词 青光眼;并发症;角膜损伤
中图法分类号 R775

参考文献

1 李美玉. 原发性青光眼. 见:刘家琦,李凤鸣主编. 实用眼科学. 北京:人民卫生出版社,1992:354～381
2 马世英. 巩膜扩张和巩膜葡萄肿. 见:杨 钧主编. 现代眼科手册. 北京:人民卫生出版社,1993:365～366

(收稿:1995-09-02;修回:1996-03-27)
(编辑 张大春)

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