

复方活血汤对辐射损伤小鼠骨髓基质细胞粘附功能的影响*

刘文励 黄 伟 何美冬 孙汉英 肖侃艳

内容提要 目的:研究常用活血化瘀中药对急性放射损伤小鼠骨髓基质细胞粘附功能的影响。方法:小鼠接受 8GY⁶⁰Co γ 射线照射后立即腹腔注射 100% 复方活血汤液 0.2ml, 每天 2 次, 连续 6 天, 第 7 天取股骨骨髓制备有核细胞 (bone marrow cell, BMC) 悬液, 按长期骨髓细胞培养技术, 第 12 天计数成纤维细胞集落形成单位 (fibroblast colony forming unit, CFU-F), 第 28 天观察培养的基质细胞层对正常小鼠 BMC 的粘附能力。结果:正常小鼠骨髓培养的基质细胞层粘附正常小鼠 BMC 的能力为 $67.8 \pm 17.2\%$, 复方活血汤组为 $55.8 \pm 10.5\%$, 差异无显著意义 ($P > 0.05$); 对照组为 $47.7 \pm 13.6\%$, 显著低于正常组 ($P < 0.02$)。结论:常用活血化瘀中药能增强急性放射损伤小鼠骨髓基质细胞粘附功能。

关键词 放射损伤 基质细胞 骨髓 粘附能力 活血化瘀中药

Effects of Composite Blood-Activating Decoction on Adhesive Function of Bone Marrow Stroma Cells in Radiation Injured Mice LIU Wen-li, HUANG Wei, He Mei-dong, et al Tongji Hospital, Tongji Medical University, Wuhan (430030)

Objective: To evaluate the effect of commonly used "blood activating and stasis-removing" Chinese herbal drugs on adhesive function of bone marrow stroma cells in acute radiation injured mice. **Methods:** after irradiation by 8 Gy ⁶⁰Co γ-ray, each mouse was intraperitoneally injected immediately with 0.2 ml 100% composite blood-activating decoction (CBAD) twice a day for 6 days. On the 7th day, the femura were taken and the bone karyocyte (BMC) suspension was made. According to long term bone marrow culture procedure, on the 12th day, the fibroblastic colony forming units were counted, and on the 28th day, the adhesion of culture stroma cells to normal murine BMC was observed. **Results:** The adhesion of culture stroma cells to normal murine BMC was $67.8 \pm 17.2\%$ in normal group, while in CBAD group, it was $55.8 \pm 10.5\%$. The difference was insignificant ($P > 0.05$). In the control group, the value was $47.7 \pm 13.6\%$, which was significantly lower than that in normal group ($P < 0.02$). **Conclusion:** The commonly used "blood-activating and stasis-removing" Chinese herbal drugs can enhance the adhesive function of bone marrow stroma cells in acute radiation injured mice.

Key words radioactive injury, bone marrow, stroma cell, adhesion function, blood-activating and stasis removing Chinese herbal drugs

骨髓基质细胞在调节造血细胞的增生和分化中起活性作用^①, 造血细胞粘附到基质细胞是其相互作用的第一步。至目前, 尚未见活血化瘀中药作用于这种粘附功能的报告, 我们观察了常用活血化瘀中药丹参、当归、川芎、赤芍组成的复方制剂对急性放射小鼠骨髓体

外培养的基质细胞粘附功能的影响, 报告如下。

材料与方法

- 1 动物 清洁级昆明小白鼠 30 只, 雌性, 同批鼠龄 7~8 周, 体重 18~22g, 由本校实验动物中心提供。
- 2 药物 复方活血汤注射液由丹参、全当归、川芎、赤芍按 2:2:1:1 比例组成, 水煎、醇沉、过滤, 配制成 100% 药液 (即每毫升含生药 1g), 分装灭菌

* 国家自然科学基金资助课题 (No. 39470883)
同济医科大学附属同济医院 (武汉 430030)

(由我院药理研究室提供)。

3 试剂及仪器 RPMI₁₆₄₀培养液、20%小牛血清、青霉素、链霉素(均由 Gibco 公司提供), 氢化可的松(sigma 公司产品), 淋巴细胞分离液(上海试剂二厂生产), 倒置显微镜(Olympus 公司产品)。

4 造模及分组处理 小鼠随机分 3 组, 每组 10 只。正常组: 即未照射组。复方活血汤组: 小鼠用⁶⁰Co γ射线治疗机行全身照射, 每只吸收剂量 8Gy, 剂量率 0.43Gy/min, 受照后即给复方活血汤注射液腹腔内注射, 每只 0.2ml, 每天 2 次, 连续 6 天。对照组: 照射方法、剂量同上, 照射后即给无菌生理盐水腹腔内注射, 每只 0.2ml, 每天 2 次, 连续 6 天。

5 小鼠骨髓细胞(BMC)悬液制备 照射后第 7 天, 断颈处死小鼠, 无菌条件下取股骨, 用带有 5 号针头的 5ml 注射器吸取 RPMI₁₆₄₀培养液, 反复冲洗骨髓腔, 将骨髓细胞收集在灭菌离心管内, 并反复冲打, 使骨髓细胞充分分散, 制成悬液。将充分混匀的细胞悬液以 1:1 比例加在淋巴细胞分离液的表面上, 离心 20min (700g), 分离出单个核细胞层, 将此层细胞吸出悬浮于 20ml RPMI₁₆₄₀培养液中, 离心 10min (900g), 弃去上清液, 将沉淀细胞加入适量培养液充分混匀, 制成悬液计数, 经台盼蓝鉴定细胞活性在 95% 以上。

6 培养体系制备 RPMI₁₆₄₀培养液加入 20% 小牛血清(V/V), 每 10ml 培养液加 10^{-6} mol/L 氢化可的松液 0.1ml (使最终浓度为 10^{-6} mol/L), 加青、链霉素各 0.1ml (使最终浓度分别为 100u/ml), 再加已制备好的 BMC 悬液, 使细胞浓度为 2×10^6 /ml⁽²⁾。

7 成纤维细胞集落形成单位(CFU-F)的培养 将上述 BMC 悬液 1ml 接种于 24 孔培养板中, 置 37℃ 含 7%CO₂ 饱和湿度的 CO₂ 培养箱内孵育, 每周半量换液 1 次。第 12 天于倒置显微镜下计数, 由 40 个以上成纤维细胞组成的集落为 1 个 CFU-F。

8 骨髓基质细胞层的粘附能力测定 将上述骨髓 CFU-F 继续培养, 第 28 天基质形成后, 用 PBS 液轻轻冲洗 2 次, 以去除悬浮细胞, 后各孔加入细胞浓度为 5×10^6 /ml 的含 20% 小牛血清的正常昆明小鼠的 BMC 1ml, 37℃、CO₂ 培养箱中培养 2h, 用 RPMI₁₆₄₀培养液轻轻冲洗 2 次, 收集并计数未粘附的 BMC, 按下公式分别计算中药组与对照组小鼠骨髓基质细胞层对正常 BMC 粘附能力: $(1 - \frac{\text{未粘附细胞数}}{5 \times 10^6}) \times 100\%$ 。

9 统计学方法 数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 *t* 检验。

结 果

1 复方活血汤对急性放射损伤小鼠骨髓 CFU-F 计数的影响 从附表见, 受照后小鼠立即给复方活血汤治疗, 其 CFU-F 明显高于对照组, $P < 0.001$ 。

2 复方活血汤对急性放射损伤小鼠骨髓基质细胞粘附功能的影响 对照组小鼠骨髓培养的基质细胞层粘附正常小鼠 BMC 的能力显著低于正常组, $P < 0.05$; 而复方活血汤组与正常组之间差异无显著性意义, $P > 0.05$ 。

附表 复方活血汤对 8Gy⁶⁰Co γ射线照射小鼠 CFU-F、基质细胞粘附能力的影响($\bar{x} \pm s$)

组 别	鼠数	CFU-F	基质细胞粘附能力(%)
正 常	10	95.0±13.6	67.8±17.2
对 照	10	38.4±9.1 ^{△△}	47.7±13.6 [△]
复方活血汤	10	78.9±10.5 [*]	55.8±10.5

注: 与对照组比较, * $P < 0.001$, 与正常组比较, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.001$

讨 论

骨髓长期培养体系中的基质细胞层最近似于体内造血状况, 是研究基质细胞和造血细胞间相互作用的最合适模型。造血干细胞需要在基质细胞层这一特定微环境中才能生长繁殖, 成纤维样细胞是具有微环境功能的细胞, 其在培养瓶底形成集落(CFU-F), 由成纤维祖细胞生成, 后者为基质细胞中的一种主要成分⁽²⁾。

关于造血干细胞粘附于骨髓基质细胞存在特殊、复杂的机制。如 Aizawa 报告从胎牛骨髓分离纯化的四肽 ACSDKP 能增强骨髓造血细胞粘附于基质细胞, 是通过其活化基质细胞实现的⁽¹⁾。Tavassoli 认为干细胞归宿于骨髓的分子机制, 是干细胞表面的内源性凝集素样受体与基质细胞表面含糖类结构中的糖基的特异性识别和结合, 其半乳糖侧链和甘露糖侧链对干细胞表面的凝集素样结构是特异的⁽³⁾。常用活血化瘀中药增强骨髓基质细胞粘附功能的机制有待研究。

参 考 文 献

1. Aizawa S, Toyama K, Mori KJ, et al. Biological Activities of Tetrapeptide ACSDKP on Hemopoietic cell Binding to the stromal cell in Vitro. Exp Hematol 1992; 20 (7): 896—899.
2. 唐佩弦, 杨天楹主编. 造血细胞培养技术. 第 1 版. 西安: 陕西科学技术出版社, 1985: 147—160.
3. Tavassoli M, Hardy CI, Aizawa S, et al. molecular mechanism of hematopoietic stem cell binding to the supportive stroma. Prog Clin Biol Res 1990; 352: 87—90.

(收稿: 1996—09—09 修回: 1997—01—14)