

川芎嗪对急性放射损伤小鼠骨髓碱性成纤维细胞生长因子及其受体表达水平的影响

吴 宁 孙汉英 刘文励 孟凡凯 刘振芳 徐慧珍 路 武 谢 瑶

摘要 目的 探讨急性放射损伤小鼠骨髓碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)及其受体(basic fibroblast growth factor receptor, bFGFR)的表达及川芎嗪对其影响。**方法** 56 只清洁级昆明小鼠,随机分为 3 组:正常组,急性放射损伤对照组,川芎嗪组。将对照组和川芎嗪组小鼠用 $6.0\text{Gy}^{60}\text{Co}\gamma$ 射线一次性全身均匀照射,吸收剂量率为 $0.56\text{Gy}/\text{min}$ 。照射后即分别胃饲生理盐水 $0.2\text{ml}/\text{只}$ 及川芎嗪 $2\text{mg}/\text{只}$,每天 2 次,连续 13 天。分别于照射后第 3、7、14 天颈椎脱臼法处死小鼠,取双侧股骨骨髓细胞制备单个核细胞(bone marrow mono-nuclear cells, BMMNC)悬液,用流式细胞仪检测小鼠 BMMNC 表面 bFGFR 的表达水平;取单侧胫骨切片后用免疫组织化学 SABC-AP 法检测小鼠骨髓组织中 bFGF 的表达水平。**结果** 急性放射损伤后第 3、7、14 天,对照组、川芎嗪组小鼠骨髓组织中 bFGF 表达显著低于正常组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),同一时间点川芎嗪组 bFGF、bFGFR 的表达均显著高于对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** 川芎嗪通过促进骨髓组织中 bFGF、BMMNC 表面 bFGFR 的表达加速骨髓造血微环境的修复,可能是川芎嗪促进急性放射损伤后骨髓造血重建机制之一。

关键词 川芎嗪;放射损伤;骨髓微环境;碱性成纤维细胞生长因子;碱性成纤维细胞生长因子受体

Effect of Ligustrazine on Expressions of Basic Fibroblast Growth Factor and Its Receptor in Bone Marrow of Mice with Acute Radiation Injury WU Ning, SUN Han-ying, LIU Wen-li, et al *Department of Hematology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan (430030)*

Objective To study the expressions of basic fibroblast growth factor (bFGF) and its receptor (bFGFR) in bone marrow of mice with acute radiation injury, and to evaluate the effect of Ligustrazine (Lt) on them. **Methods** Fifty-six Kunming mice of clean grade were randomly divided into 3 groups, the normal group, the control group and the Lt group. Mice in the latter two groups were once homogeneously systemic irradiated with 6.0Gy of ^{60}Co , with the absorption dose rate of $0.56\text{Gy}/\text{min}$, then treated with saline ($0.2\text{ml}/\text{mice}$) or Lt ($2\text{mg}/\text{mice}$) respectively, twice a day through gastrogavage for successive 13 days. Mice were sacrificed in batch on the 3rd, 7th and 14th day by cervical dislocation to collect the bilateral femoral bone marrow for preparing bone marrow mono-nuclear cell (BMMNC) suspension. The bFGFR expression on surface of BMMNC was determined by flow cytometry; and the bFGF expression level in one side of femoral bone marrow tissue was detected by immunohistochemistry with SABC-AP assay. **Results** The bFGF expression in bone marrow of mice on the 3rd, 7th and 14th day after acute radiation injury all were significantly lower than that of the normal mice ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The expressions of bFGF and bFGFR in the Lt group detected were significantly higher than that in the control group detected at the corresponding time points ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** By way of enhancing bFGF expression in bone marrow and bFGFR expression on surface of BMMNC to accelerate the repairing of homopoietic micro-environment in bone marrow might be one of the mechanisms of Lt in promoting hemopoietic function reconstitution after acute radiation injury.

Key words Ligustrazine; radiation injury; micro-environment of bone marrow; basic fibroblast growth factor; basic fibroblast growth factor receptor

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.39870926)

作者单位:华中科技大学同济医学院附属同济医院血液科(武汉 430030)

通讯作者:孙汉英, Tel: 027-83662829, E-mail: wuningsd@yahoo.

com.cn

骨髓造血微环境主要由基质细胞、细胞外基质和微血管系统组成。 γ 射线在杀伤骨髓造血细胞的同时,也损伤骨髓造血微环境。碱性成纤维细胞生长因

子(bFGF)是一种单链多肽^[1],它含有 154 个氨基酸^[2],与其特异性受体(bFGFR)结合后刺激内皮细胞增殖、移行,在胚胎发育和血管形成中起重要作用,为一种血管新生诱导因子。近年研究发现,bFGF 参与骨髓造血组织、细胞的形成,在造血调控中起重要作用^[3]。我们通过观测急性放射损伤小鼠骨髓组织切片中 bFGF、骨髓单个核细胞表面 bFGFR 表达水平的变化,探讨 bFGF、bFGFR 在骨髓微环境修复过程中的作用;并通过观察川芎嗪在此过程中对骨髓中 bFGF、bFGFR 表达水平的影响,以进一步阐明川芎嗪促进急性放射损伤后骨髓造血重建的机制。

材料和方法

1 实验动物 清洁级昆明小鼠,同批鼠龄 6~8 周,体重 16~20g,雌雄兼用,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。于照射前 3 天至照射后 14 天以每只 200U/d 的剂量喂庆大霉素水清洁胃肠道。

2 药物 磷酸川芎嗪注射液,浓度 20mg/ml,丽珠利民制药厂生产,批号为 20010621。

3 试剂和仪器 兔抗小鼠 bFGF 单抗(小鼠 IgM,北京中山生物技术有限公司),浓缩型 SABC-AP 免疫组化试剂盒(北京中山生物技术有限公司),FITC-山羊抗兔 IgM 单抗(北京中山生物技术有限公司),流式细胞仪(Becton Dickinson FACSORT),HPIAS-1000 高清晰度彩色病理图像测定系统(华中科技大学同济医学院千屏影像公司)。

4 分组及处理 清洁级昆明小鼠 56 只,随机分为 3 组。正常组(8 只),未做任何处理;对照组及川芎嗪组各 24 只,总剂量 6.0 Gy ⁶⁰Coγ 射线全身均匀照射,剂量率为 0.56 Gy/min;照射后,川芎嗪组小鼠立即胃饲磷酸川芎嗪注射液每只 2mg,每天 2 次;对照组胃饲生理盐水每只 0.2ml,每天 2 次。以上两组均用药至处死观察为止。

5 骨髓单个核细胞(BMMNC)计数 小鼠处死后,称重,浸入 75%乙醇中 3min,取双侧股骨,用 RPMI 1640 从骨髓腔冲出单个核细胞,按白细胞计数方法,计数单个核细胞。

6 骨髓组织切片中 bFGF 的表达水平 立即取一侧肱骨,常规固定脱钙,石蜡包埋,矢状面切片(3μm),按说明书常规脱蜡至水、复合消化液消化 30min、山羊血清封闭 20min、以 1:50 稀释度加入一抗(兔抗小鼠 bFGF 单抗)4℃ 孵育过夜、0.01mmol/L TBS(NaCl+Tris+乙酸)洗 3 次×5min 后,加入生物素化二抗(山羊抗兔 IgM)37℃ 孵育 20min、TBS 洗 3

次×5min 后,加入 SABC-AP 37℃ 孵育 20min、TBS 洗 4 次×5min 后,加入 DAB 显色剂显色约 10min,水冲洗,脱水干燥后封片,计算机图像分析测量 bFGF 阳性面积百分数。

7 BMMNC 表面 bFGFR 的表达水平 将 3、7、14 天小鼠分别处死后,制备 BMMNC 悬液,计数调细胞浓度为 2×10⁶/ml,按常规方法制备流式细胞样本,标记一抗即兔抗小鼠 bFGFR 单抗(1:400 稀释度),4℃ 孵育 30min 后离心弃上清,经冷 PBS 洗 2 次后,加入二抗即 FITC-山羊抗兔 IgM 单抗(1:100 稀释度),4℃ 孵育 30min 后离心弃上清,冷 PBS 洗 2 次后,加入 1%多聚甲醛固定,置 4℃ 避光保存,6h 内流式细胞仪检测骨髓单个核细胞表面 bFGFR 的荧光强度。

8 统计学分析 数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 10.0 进行 *t* 检验和相关分析。

结 果

1 BMMNC 计数 见表 1。照射后对照组和川芎嗪组的 BMMNC 均显著低于正常组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),第 14 天 BMMNC 数仍未恢复正常;川芎嗪组在第 7、14 天的 BMMNC 数均显著高于对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2 骨髓组织切片中 bFGF 的表达水平分析 见表 1。照射后对照组和川芎嗪组骨髓组织中 bFGF 的表达水平均显著低于正常组($P < 0.01$),照射后第 14 天 bFGF 的表达水平仍未恢复正常;但川芎嗪组在第 3、7、14 天 bFGF 的表达水平均显著高于对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3 BMMNC 表面 bFGFR 表达水平(平均荧光强度)分析 见表 1。正常组骨髓单个核细胞表面 bFGFR 有表达。放射损伤后第 14 天,川芎嗪组 bFGFR 的表达水平显著高于对照组;3 组组间比较差异有显著性($P < 0.01$)。

表 1 各组小鼠骨髓组织中 BMMNC、bFGF 及 BMMNC 表面 bFGFR 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	放射损伤 后天数	<i>n</i>	BMMNC (×10 ⁶ /根股骨)	bFGF 表达 水平(Vol%)	bFGFR 表达水平(%)
正常		8	9.57±1.33	17.16±0.74	6.52±0.21
对照	3	8	0.28±0.11 **	6.24±0.83 **	—
	7	8	4.08±1.31 **	8.14±0.44 **	—
	14	8	7.09±1.02 **	10.78±0.72 **	7.94±0.24 **
川芎嗪	3	8	0.34±0.09 **	8.28±0.62 **△△	—
	7	8	6.41±0.48 **△△	11.28±0.83 **△△	—
	14	8	8.01±0.60 *△	12.96±1.30 **△	10.94±0.13 **△△

注:与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与对照组同期比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$

讨 论

bFGF 既是丝裂原, 又是血管生成素、细胞生长因子, 具有多种功能, 与细胞迁移、分化及组织发育有关^[4]。在体外可刺激内皮细胞增殖、分裂生长和迁移, 在体内有强烈的促血管形成作用。血管内皮细胞增殖的结果是: 一方面可使 bFGF 的含量增加, 另一方面可导致新生血管的形成。血管内皮细胞的生长和存活对于维持骨髓微循环和造血具有十分重要的作用^[5]。bFGF 促进血管形成的作用有: (1) 促进血管内皮细胞的增殖; (2) 促进内皮细胞的迁移; (2) 促进具有降解基底膜作用的蛋白酶的释放; (4) 促进内皮细胞形成管腔。bFGF 是一种“损伤激素”, 各种原因引起的细胞损伤、死亡可导致 bFGF 释放增多。血管内皮细胞、成纤维细胞、T、B 淋巴细胞、巨核细胞、单核细胞、血小板等为其特异性靶细胞, 通过与靶细胞表面特异性的 bFGFR 结合以自分泌或旁分泌的形式发挥作用。bFGF 与 bFGFR 结合后, 可促使 bFGFR 二聚化和酪氨酸磷酸化, 触发一系列信号级联传导系统, 最终将细胞外信号传入核内, 导致细胞增殖反应。bFGF 既是血管新生诱导因子, 又是造血生长因子^[5], 可以促进巨核细胞造血^[6]、单核细胞造血^[7], 还可促进造血干/祖细胞的增殖、分化^[8], 并可抑制由放射和化疗引起的造血细胞的凋亡。我们的实验结果显示: 放射损伤对照组小鼠骨髓组织切片中 bFGF 的表达水平显著低于正常组, 但其骨髓单个核细胞表面 bFGFR 的表达增多。这可能是骨髓微环境损伤后, 早期即可引起内皮细胞的 bFGF 合成增加, 进而保护或修复那些表达 bFGFR 的细胞, 即 bFGFR 的表达与内皮细胞的存活密切相关^[5]。因此, 川芎嗪增强放射损伤后单个核细胞 bFGFR 的表达, 将有利于加快并促进骨髓微循环修复, 加速造血恢复。

我们曾观察到川芎嗪通过促进骨髓静脉窦的修复, 明显增加骨髓微血管数, 增加骨髓供血, 促进基质细胞生长及其黏附功能, 改善骨髓微环境^[9,10]。本实验结果显示川芎嗪显著增强放射损伤后小鼠骨髓组织中 bFGF 的表达, 同时增加骨髓单个核细胞表面 bFGFR 的表达。这可能是川芎嗪促进放射损伤后骨髓造血重建机制之一, 且可能是川芎嗪通过 bFGF/bFGFR 促进骨髓微循环修复而实现的。

参 考 文 献

- 1 Harada K, Grossman W, Friedman M. et al. Basic fibroblast growth factor improves myocardial function in chronically ischemic porcine hearts. *J Clin Invest* 1994;94(2):623—630.
- 2 Landau C, Jacobs AK, Haudenschild CC. Intrapericardial basic fibroblast growth factor induces myocardial angiogenesis in a rabbit model of chronic ischemia. *Am Heart J* 1995;129:924—931.
- 3 Allouche M, Bikfalvi A. The role of fibroblast growth factor-2 (FGF-2) in hematopoiesis. *Prog Growth Factor Res* 1995;6(1):35—48.
- 4 熊 盛, 林 剑, 姚汝华, 等. 碱性成纤维细胞生长因子与肝素结合性质的研究进展. *中国病理生理杂志* 2002;18(2):214—217.
Xiong S, Lin J, Yao RH, et al. Advances in the research of bFGF binding to heparin. *Chin J Pathophysiol* 2002;18(2):214—217.
- 5 Andreas B, Zong CH, Guy Fuhrmann. Interaction of fibroblast growth factor with megakaryocytopoiesis and demonstration of FGF receptor expression in megakaryocytes and megakaryocytic-like cells. *Blood* 1992;80(8):1905—1913.
- 6 Bikfalvi A, Han ZC. Angiogenic factors are hematopoietic growth factors and vice versa. *Leukemia* 1994;8(3):523.
- 7 Wilson EL, Rifkin DB, Kelly F, et al. Basic fibroblast growth factor stimulates myelopoiesis in long-term human bone marrow cultures. *Blood* 1991;77(5):954.
- 8 Gabianelli M, Sargiacomo M, Pelosi E, et al. “Pure” human hematopoietic progenitors: permissive action of basic fibroblast growth factor. *Sci* 1990;249(28):1561—1564.
- 9 孙汉英, 舒砚君, 刘文励, 等. 川芎嗪改善免疫诱导再生障碍性贫血小鼠骨髓微环境作用的研究. *中华血液学杂志* 1998;19(4):178—180.
Sun HY, Shu YJ, Liu WL, et al. Study on the improvement of bone marrow microenvironment by Ligustrazine in immune-induced aplastic anemia mice. *Chin J Hematol* 1998;19(4):178—180.
- 10 周银莉, 刘文励, 孙汉英, 等. 川芎嗪对 BMT 小鼠早期造血重建的作用研究. *中华血液学杂志* 2002;23(4):207—208.
Zhou YL, Liu WL, Sun HY, et al. Study on the effect of ligustrazine on histogenesis in the early phase of bone marrow transplantation mice. *Chin J Hematol* 2002;23(4):207—208.

(收稿:2002-07-17 修回:2004-02-10)