

重组人骨形成蛋白成熟肽-4 对辐射小鼠骨髓造血损伤的修复作用

刘绍凡, 陈 愉, 万锐杰, 徐敏敏(重庆市中医院骨科 400016)

【摘要】 目的 探讨小鼠受到辐射后, 重组人骨形成蛋白成熟肽-4(rhBMP-4m)对辐射引起的骨髓造血损伤的修复作用。方法 通过⁶⁰Co γ 射线照射, 建立小鼠骨髓造血损伤模型, 经 rhBMP-4m 连续治疗后, 抽血检测小鼠外周血白细胞数, 并进行骨髓单个核细胞计数, 对脾结节进行计数并通过流式细胞仪检测骨髓单个核细胞中 CD34⁺ 细胞比例, 比较辐射组和实验组之间的差别。结果 经 rhBMP-4m 治疗的小鼠, 白细胞数、单个核细胞数、脾结节数和 CD34⁺ 细胞比例均明显高于辐射组($P < 0.05$)。结论 对于辐射引起的小鼠骨髓造血损伤, rhBMP-4m 能够加快骨髓造血系统的重建。

【关键词】 辐射损伤; 重组人骨形成蛋白成熟肽-4; CD34⁺

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2013.19.006 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2013)19-2510-03

Restoring effect of rhBMP-4m on bone marrow hematopoietic injury induced by irradiation in mice LIU Shao-fan, CHEN Yu, WAN Rui-jie, XU Min-min (Department of Orthopedics, Hospital of Traditional Chinese Medicine of Chongqing City, Chongqing 400016, China)

【Abstract】 Objective To explore the restoring effect of recombinant human bone morphogenetic protein-4m (rhBMP-4m) on bone marrow hematopoietic injury induced by irradiation in mice. Methods Animal models of bone marrow hematopoietic injury were established by radiating with ⁶⁰Co γ -ray. After continuous treatment with rhBMP-4m, the number of white blood cells (WBC) in peripheral blood, and total and CD34⁺ mononuclear cells in bone marrow were detected. Results The number of WBC, mononuclear cells and the proportion of CD34⁺ cells in experiment group were higher than radiation group ($P < 0.05$). Conclusion rhBMP-4m could accelerate the restoring process of hematopoietic function in mice with bone marrow hematopoietic injury induced by irradiation.

【Key words】 radiation damage; rhBMP-4m; CD34⁺

作为骨形态发生蛋白(BMPs)家族的重要成员, BMP4 不仅具有诱导骨形成的能力, 其对机体造血系统的形成及发育也具有显著促进作用, 可诱导造血干细胞向三系造血细胞转化^[1-4]; 不仅如此, BMP4 在促进干细胞分化的同时, 可保护相当数量的干细胞, 促进造血前体细胞的增殖, 从而使骨髓的增殖能力更加持久^[5]。骨髓、脾脏等是机体重要的造血器官, 对辐射损伤高度敏感^[6]。亚致死剂量和致死剂量照射后骨髓造血细胞可大量死亡, 照射剂量大时造血干细胞受损严重, 机体造血功能很难自行恢复^[7-9]。本研究通过⁶⁰Co γ 射线照射小鼠, 建立骨髓造血损伤动物模型, 初步探讨成年动物经辐射损伤后, 重组人骨形成蛋白成熟肽-4(rhBMP-4m)对其造血系统的修复作用, 从而为进一步研究 BMP4 促进造血的机制及未来的临床应用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物模型制备 雄性 BALB/c 纯系小鼠 90 只, 年龄在 6~8 周, 体重(21±2)g, 购自重庆医科大学动物实验中心。实验动物随机分组, 其中对照组 30 只, 辐射组 30 只, 实验组(照射后经 rhBMP-4m 治疗)30 只。除对照组外, 其他各组小鼠均接受⁶⁰Co γ 射线照射, 照射剂量 7 Gy, 吸收剂量率为 1.45 Gy/min。

1.1.2 主要试剂和仪器 rhBMP-4m 为本室保存; Ficoll 淋巴细胞分离液, 比重(1.077±0.001), 购自华美公司; CD34 单抗及 IgG 对照抗体均购自 Abcam 公司; 动物血细胞计数仪 MEDONIC CA620(瑞典 Boule Medical AB 公司); 流式细胞仪

Elite ESP(美国 Counter 公司)。

1.2 方法 除对照组外, 其余各组照射 24 h 后, 辐射组小鼠每天腹腔注射生理盐水 1.0 mL, 实验组小鼠每天腹腔注射 rhBMP-4m 0.5 mg, 连续治疗 6 d。照射后第 1、3、5、7、9 天分别对各组动物进行血细胞计数; 脱颈处死动物, 观察骨髓单个核细胞数及 CD34⁺ 细胞百分率的变化, 观察并计数脾结节的生成及数量变化。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 外周血白细胞计数 照射后第 1、3、5、7、9 天分别对各组小鼠尾静脉采血, 立即于动物血细胞计数仪上进行血细胞计数。

1.3.2 骨髓单个核细胞的分离和纯化 照射后第 1、3、5、7、9 天脱颈处死动物, 制备骨髓细胞悬液, 按照 Ficoll 密度梯度离心法, 分离和纯化骨髓单个核细胞, 显微镜下细胞计数。

1.3.3 流式细胞仪检测骨髓 CD34⁺ 细胞百分率 制备骨髓单个核细胞悬液, 调整细胞密度为 1×10^9 /L, 分别加入 CD34⁺ 抗体和 IgG 对照抗体, 室温避光染色 30 min, 磷酸盐缓冲液(PBS)离心冲洗, 流式细胞仪测定骨髓单个核细胞中 CD34⁺ 细胞的百分率。

1.3.4 脾结节计数 照射后第 9 天脱颈处死动物, 分离并观察小鼠脾脏表面有无结节形成, 并进行计数。

1.4 统计学处理 全部数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS10.0 统计软件进行 t 检验, 分析各组间结果的差异。

2 结 果

2.1 外周血白细胞计数结果 小鼠受到辐射以后, 外周血白

细胞数首先出现一过性升高,随后迅速降低,明显低于正常水平,而经 rhBMP-4m 治疗后,自 7 d 开始,外周血白细胞数明显升高,与辐射组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 骨髓单个核细胞计数结果 小鼠受到照射后,骨髓中单个核细胞数迅速下降,明显低于正常水平,而经 rhBMP-4m 治疗后,骨髓单个核细胞数自 7 d 明显高于辐射组($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 骨髓单个核细胞中 CD34⁺ 细胞的百分率变化 对照组

骨髓单个核细胞中 CD34⁺ 细胞的百分率为 $7.32\% \pm 0.37\%$,照射后 1 d, CD34⁺ 细胞的百分率下降为 $1.27\% \pm 0.19\%$,与对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.01$)。照射后 7 d,辐射组 CD34⁺ 细胞的百分率为 $2.12\% \pm 0.20\%$,实验组则增加为 $2.88\% \pm 0.30\%$,与辐射组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。照射 9 d,辐射组 CD34⁺ 细胞的百分率为 $(2.39 \pm 0.32)\%$,实验组则增加为 $3.38\% \pm 0.31\%$,与辐射组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

表 1 受辐射后各组小鼠外周血白细胞计数 ($\bar{x} \pm s, \times 10^9/L$)

组别	n	1 d	3 d	5 d	7 d	9 d
对照组	6	7.02 ± 0.38	6.89 ± 0.26	6.96 ± 0.18	7.16 ± 0.35	6.80 ± 0.33
辐射组	6	8.83 ± 0.37 ^a	2.12 ± 0.36 ^a	1.26 ± 0.27 ^a	1.36 ± 0.40 ^{va}	1.80 ± 0.26 ^a
实验组	6	8.79 ± 0.34	2.33 ± 0.33	1.41 ± 0.31	2.82 ± 0.42 ^b	3.88 ± 0.26 ^b

注:与对照组比较,^a $P < 0.01$;与辐射组比较,^b $P < 0.01$ 。

表 2 受辐射后各组骨髓单个核细胞计数 ($\bar{x} \pm s, \times 10^6/L$)

组别	n	1 d	3 d	5 d	7 d	9 d
对照组	6	17.67 ± 1.90	17.37 ± 1.42	17.44 ± 1.58	17.66 ± 1.77	17.60 ± 1.72
辐射组	6	2.66 ± 0.82 ^a	2.86 ± 0.43 ^a	3.64 ± 0.37 ^a	4.13 ± 0.26 ^a	4.36 ± 0.26 ^a
实验组	6	2.64 ± 0.69	3.06 ± 0.33	3.92 ± 0.27	5.16 ± 0.31 ^b	6.58 ± 0.36 ^b

注:与对照组比较,^a $P < 0.01$;与辐射组比较,^b $P < 0.01$ 。

表 3 受辐射后骨髓单个核细胞中计数 CD34⁺ 细胞的百分率 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	n	1 d	3 d	5 d	7 d	9 d
对照组	6	7.32 ± 0.37	7.02 ± 0.55	7.26 ± 0.45	7.36 ± 0.25	7.30 ± 0.33
辐射组	6	1.27 ± 0.19 ^a	1.36 ± 0.23 ^a	2.03 ± 0.29 ^a	2.12 ± 0.20 ^a	2.39 ± 0.32 ^a
实验组	6	1.34 ± 0.22	1.66 ± 0.31	2.24 ± 0.27	2.88 ± 0.30 ^b	3.38 ± 0.31 ^b

注:与对照组比较,^a $P < 0.01$;与辐射组比较,^b $P < 0.01$ 。

2.4 脾结节计数 照射后第 9 天,与对照组相比,辐射组和实验组小鼠脾脏表面脾结节减少,但实验组脾结节计数和脾体比明显高于辐射组($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 照射第 9 天脾结节计数

组别	n	脾结节数	脾体比
对照组	6	17.42 ± 0.37	0.004 2 ± 0.000 3
辐射组	6	1.32 ± 0.30	0.001 7 ± 0.000 1
实验组	6	12.33 ± 0.33 ^a	0.003 5 ± 0.000 1 ^a

注:与辐射组比较,^a $P < 0.05$ 。

3 讨 论

造血系统辐射损伤后,造血功能低下甚或衰竭,白细胞数明显减少,诱发感染等并发症,增加造血组织的负担,从而形成恶性循环,最后可导致机体死亡^[10]。因此,造血系统辐射损伤被认为是急性放射病的关键病变,决定病情轻重;也是治疗的中心环节,影响预后的好坏^[11]。

由于白细胞寿命短暂,因此一旦生成减少来源中断时,数量就迅速而明显地减少。本次实验中,小鼠受到照射后,辐射组白细胞数先是明显升高,随后其白细胞数迅速降低,明显低于对照组。这是由于在重度骨髓型急性放射病时,白细胞数在照射后短时间内会出现一过性增多。增多的原因是在体液因子作用下,储存的白细胞被加速动员释放以及与脏器间的再分

配有关系。随后其白细胞数迅速降低则是由于有增殖分裂能力的幼稚细胞在照射后发生间期死亡、增殖死亡、出现坏死或凋亡的缘故。rhBMP-4m 治疗后,小鼠外周血中白细胞数从第 7 天开始明显高于辐射组,推测可能是 rhBMP-4m 在一定程度上促进了造血干细胞的分化,使其加速向终末血细胞方向分化,从而使小鼠外周血中白细胞数增加;也有可能是 rhBMP-4m 对白细胞具有某种程度的保护作用,使得白细胞数的下降幅度和速度均低于辐射组。

CD34⁺ 分子是一种高度糖基化的 I 型跨膜蛋白^[12]。它选择性地表达于造血干细胞和造血祖细胞表面,随细胞的分化成熟而逐渐减弱或消失。造血干细胞是造血系统受损后造血重建的关键。故而,通过 rhBMP-4m 治疗辐射小鼠的造血损伤,观察骨髓中 CD34⁺ 细胞比例的变化,来检测 rhBMP-4m 是否具有促进辐射损伤后造血重建的能力。本实验结果还显示,经 rhBMP-4m 治疗后,和辐射组相比,至第 7 天,其骨髓单个核细胞数明显增多,CD34⁺ 细胞比例也明显增高,恢复加快,但仍低于对照组水平。

本实验结果表明,小鼠受到照射后,造血系统受到严重损伤,导致其外周血白细胞数显著下降;同时,由于造血干/祖细胞具有很高的辐射敏感性,也被大量破坏,导致造血功能低下,CD34⁺ 细胞比例大大降低;这些变化使得造血系统无法维持稳态造血,没有足够数量的造血干/祖细胞及时分化为终末血细

胞以供机体所需,使外周血白细胞数进一步降低,形成恶性循环。而经 rhBMP-4m 治疗后,CD34⁺ 细胞比例有所增高,提示造血系统增生活跃,可能在 rhBMP-4m 作用下,残余的造血干细胞加快了自身的增殖;但是由于大剂量辐射后,造血干细胞数量极度减少,所以即使其加快增殖,短期内仍然低于正常值水平。本研究结果提示,rhBMP-4m 有可能通过作用于骨髓造血干细胞表面相应的 BMP 受体,启动信号传递过程,从而刺激造血干细胞的生长和分化,调节骨髓细胞中相应蛋白的表达,促进造血干/祖细胞数量增加,加速其向终末血细胞发展,对辐射小鼠造血系统的恢复起到了重要作用。这说明骨髓造血系统受到辐射损伤后,rhBMP-4m 能够促进造血干细胞的增殖,加快外周血白细胞数的增长,有利于骨髓造血重建的尽快恢复。为今后进一步研究 rhBMP-4m 在骨髓造血中的机制及临床应用打下了基础。

参考文献

- [1] Canalis E, Economides AN, Gazzerro E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton[J]. *Endocr Rev*, 2003, 24(2): 218-235.
- [2] Liem KF Jr, Tremml G, Roelink H, et al. Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm[J]. *Cell*, 1995, 82(6): 969-979.
- [3] Li F, Lu S, Vida L, et al. Bone morphogenetic protein 4 induces efficient hematopoietic differentiation of rhesus monkey embryonic stem cells in vitro[J]. *Blood*, 2001, 98(2): 335-342.
- [4] Honig GR, Li F, Lu SJ, et al. Hematopoietic differentiation of rhesus monkey embryonic stem cells[J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2004, 32(1): 5-10.
- [5] Chadwick K, Wang L, Li L, et al. Cytokines and BMP-4

promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells[J]. *Blood*, 2003, 102(3): 906-915.

- [6] Allsopp RC, Cheshier S, Weissman IL. Telomere shortening accompanies increased cell cycle activity during serial transplantation of hematopoietic stem cells [J]. *J Exp Med*, 2001, 193(8): 917-924.
- [7] De Vries A, Holzberger P, Kunc M, et al. Influence of irradiation on neutrophilic granulocyte function[J]. *Cancer*, 2001, 92(9): 2444-2450.
- [8] Steptoe RJ, Stankovic S, Lopaticki S, et al. Persistence of recipient lymphocytes in NOD mice after irradiation and bone marrow transplantation[J]. *J Autoimmun*, 2004, 22(2): 131-138.
- [9] Inoue T, Hirabayashi Y, Mitsui H, et al. Survival of spleen colony-forming units (CFU-S) of irradiated bone marrow cells in mice; evidence for the existence of a radioresistant subfraction[J]. *Exp Hematol*, 1995, 23(12): 1296-1300.
- [10] Drize NI, Gurevich OA, Chertkov IL. Radiosensitivity of stromal precursors and mature hematopoietic stromal cells in a culture [J]. *Radiobiologiya*, 1986, 26(3): 345-350.
- [11] Choy H, Kim DW. Chemotherapy and irradiation interaction[J]. *Semin Oncol*, 2003, 30(4 Suppl 9): 3-10.
- [12] Hoxha E, Fehse B, Ortmeyer G, et al. Overexpression of the p85alpha regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase inhibits GM-CSF-dependent colony formation of CD34⁺ hematopoietic progenitor cells[J]. *Leuk Lymphoma*, 2008, 49(6): 1206-1208.

(收稿日期: 2013-01-21 修回日期: 2013-05-12)

(上接第 2509 页)

- 疗急性重型颅脑损伤的量效关系[J]. *中国微侵袭神经外科杂志*, 2007, 12(4): 151-153.
- [2] 涂艳阳, 付建芳, 付菊芳, 等. 不同剂量纳洛酮对重型颅脑损伤后 β -内啡肽影响的实验研究[J]. *实用预防医学*, 2011, 18(3): 494-495.
- [3] Hall ED, Springer JE. Neuroprotection and acute spinal cord injury: a reappraisal[J]. *NeuroRx*, 2004, 1(1): 80-100.
- [4] 朱新波, 王菊香, 林丹. 纳洛酮对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤血浆 β -EP 和 VIP 的影响[J]. *中国药理学通报*, 2005, 21(6): 760-761.
- [5] 荆俊杰, 王守森, 杨庆武, 等. 大鼠二次脑损伤后脑内 c-fos 基因表达和血浆 β -内啡肽的变化及意义[J]. *中国临床神经外科杂志*, 2007, 12(1): 34-38.
- [6] 陈宗跃, 焦丽强. 大剂量纳洛酮治疗重度颅脑损伤疗效观察[J]. *现代中西医结合杂志*, 2012, 21(1): 51-52.
- [7] 李小平, 范国华, 杨庆武, 等. 纳洛酮治疗重型颅脑损伤临

床疗效[J]. *第四军医大学学报*, 2007, 28(21): 2016.

- [8] 段海涛. 纳洛酮治疗重型颅脑损伤的临床观察[J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2012, 15(7): 59-60.
- [9] 刘岩. 纳洛酮治疗 39 例重度颅脑损伤的临床效果观察[J]. *中国现代药物应用*, 2012, 6(17): 14-15.
- [10] Joosse P, Saltzherr TP, van Lieshout WA, et al; Trauma-Net AMC and collaborating hospitals. Impact of secondary transfer on patients with severe traumatic brain injury [J]. *J Trauma Acute Care Surg*, 2012, 72(2): 487-490.
- [11] 陈宗跃, 焦丽强. 大剂量纳洛酮治疗重度颅脑损伤疗效观察[J]. *现代中西医结合杂志*, 2012, 21(1): 51-52.
- [12] 陈大庆, 张志军. 重型颅脑损伤患者颅内压变化及纳洛酮的治疗作用[J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2006, 9(1): 43-44.

(收稿日期: 2013-01-26 修回日期: 2013-05-28)