

【基础研究】

中图分类号: R742.5 文献标志码: A 文章编号: 1004-7239(2017)12-1043-05

通信作者:曹冰清(1984-),女,陕西西安人,硕士,主治医师,研究方向:帕金森病、生物转化;E-mail:569689538@qq.com.

white blood cells of mice between rhBMP-4m treatment group and model group on the third, fifth day after irradiation ($P > 0.05$); the peripheral white blood cell count of mice in rhBMP-4m treatment group was significantly higher than that in model group on the seventh, ninth day after irradiation ($P < 0.05$). The number of marrow mononuclear cells of mice in model group was significantly lower than that in the normal control group at each time point after irradiation ($P < 0.05$). There was no statistic difference in the number of marrow mononuclear cells of mice between the rhBMP-4m treatment group and model group on the first, third day after irradiation ($P > 0.05$); the number of marrow mononuclear cells of mice in rhBMP-4m treatment group was significantly higher than that in the model group on the fifth, seventh, ninth day after irradiation ($P < 0.05$). The proportion of CD34⁺ cells in mononuclear cells of mice in model group was significantly lower than that in the normal control group at each time point after irradiation ($P < 0.01$). There was no statistic difference in the proportion of CD34⁺ cells in mononuclear cells of mice between the rhBMP-4m treatment group and model group on the first, third day after irradiation ($P > 0.05$); the proportion of CD34⁺ cells in mononuclear cells of mice in rhBMP-4m treatment group was significantly higher than that in the model group on the fifth, seventh, ninth day after irradiation ($P < 0.05$). Compared with the normal control group, the number of spleen nodus was increased and the spleen weight/body weight ratio of mice was decreased in model group on the ninth day after irradiation ($P < 0.05$); the number of spleen nodus and the spleen weight/body weight ratio of mice in rhBMP-4m treatment group were significantly higher than those in the model group on the ninth day after irradiation ($P < 0.01$). **Conclusion** rhBMP-4m can accelerate the reconstruction of bone marrow hematopoietic system of mice with hematopoietic system injury induced by irradiation.

Key words: radiolytic damage; recombinant human bone morphogenetic protein-4 mature peptide; CD34⁺

骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP) 属于转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 超家族, 具有 30 多个成员^[1]。BMP 的重要作用是诱导异位成骨或成软骨, 另外, BMP 在新陈代谢、躯体形态发生、组织重建等方面还发挥着至关重要的作用^[2]。作为 BMP 家族的重要一员, BMP4 不仅具有体外诱导成骨的能力, 对于个体发育过程也至关重要, 例如, BMP4 在胚胎早期发育过程中参与了原肠胚及中胚层的形成^[3]; 胚胎发育过程中缺乏 BMP4 会导致原始造血细胞分化发育障碍^[4]。BMP4 还能与其他因子共同作用, 促进小鼠胚胎干细胞向造血细胞分化, 而在此过程中, BMP4 由于能够有效促进中胚层的形成而起到了“开关”的作用, 从而使诱导造血的过程成为可能^[5]。辐射是导致造血系统损伤的重要因素^[6], 大剂量射线照射会导致机体造血器官及骨髓造血干细胞严重受损, 从而引发机体造血障碍, 无法恢复正常造血功能^[7-9]。BMP4 由于能够上调胚胎干细胞分化过程中多种造血基因的表达、与机体造血系统的发育和重建密切相关而受到重视^[10]。重组人骨形成蛋白成熟肽 4 (recombinant human bone morphogenetic protein-4 mature peptide, rhBMP-4m) 是以大肠杆菌系统表达制备出的具有一定生物活性的人 BMP4 成熟肽。本研究利用⁶⁰Co γ 射线对小鼠进行照射, 造成急性放射性损伤, 使其骨髓造血功能严重受损, 在此基础上利用 rhBMP-4m 对其进行治疗, 观察并评价 rhBMP-4m 对急性辐射所致骨髓造血功能障碍的

恢复作用, 并进一步研究其可能的机制, 为深入研究 rhBMP-4m 促进骨髓造血所参与的信号途径及辐射损伤治疗的临床应用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 雄性 BALB/c 纯系小鼠 90 只, 体重 (21.0 \pm 2.0) g, 购自第四军医大学实验动物中心。

1.2 主要试剂与仪器 rhBMP-4m 由第四军医大学生物化学教研室制备并惠赠, Ficoll 淋巴细胞分离液购自广州美景生物科技有限公司, 动物血细胞计数仪 XT-2000iv 购自日本 Sysmex 公司, CD34 单抗及 IgG 对照抗体均购自英国 Abcam 公司, 流式细胞仪 FACSCalibur 购自赛维科技 (北京) 有限公司。

1.3 动物处理方法 将 90 只小鼠随机分为正常对照组、模型组和 rhBMP-4m 治疗组, 每组 30 只。模型组和 rhBMP-4m 治疗组小鼠均接受⁶⁰Co γ 射线照射, 照射剂量 7 Gy, 全身照射 200 s; 正常对照组小鼠不接受照射。⁶⁰Co γ 射线照射后, rhBMP-4m 治疗组小鼠从照射后第 1 天开始每天在相同时间点腹腔注射 rhBMP-4m 0.5 mg, 连续治疗 6 d; 模型组小鼠每天在同一时间腹腔注射生理盐水 1.0 mL。

1.4 检测指标

1.4.1 外周血白细胞计数 分别于照射后第 1、3、5、7、9 天采集小鼠尾静脉血, 采集后立即于动物血细胞计数仪上进行血细胞计数。

1.4.2 骨髓单个核细胞分离和纯化 分别于照射后第 1、3、5、7、9 天分批颈椎脱臼处死小鼠 (每批每

组 6 只),制备骨髓细胞悬液,根据 Ficoll 密度梯度离心法及相关说明书操作,分离和纯化骨髓单个核细胞,显微镜下进行细胞计数。

1.4.3 骨髓 CD34⁺细胞检测 对获得的骨髓单个核细胞悬液进行稀释,将细胞密度调整为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$,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。

1.4.4 脾结节计数及脾脏质量与体质量的比值(脾体比) 照射后第 9 天小鼠称质量后颈椎脱臼处死,分离并观察小鼠脾脏表面有无结节形成,并进行计数,同时计算脾体比。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 10.0 软件进行统计

表 1 各组小鼠照射后外周血白细胞计数比较

Tab.1 Comparison of the peripheral white blood cell count of mice in each group after irradiation ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | 白细胞计数/($\times 10^9 \text{ L}^{-1}$) | | | | |
|--------------|---|--|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | | 第 1 天 | 第 3 天 | 第 5 天 | 第 7 天 | 第 9 天 |
| 正常对照组 | 6 | 7.32 \pm 0.35 | 6.55 \pm 0.27 | 6.91 \pm 0.19 | 7.19 \pm 0.21 | 6.94 \pm 0.32 |
| 模型组 | 6 | 8.91 \pm 0.37 | 2.25 \pm 0.31 ^a | 1.56 \pm 0.28 ^a | 1.26 \pm 0.41 ^a | 1.61 \pm 0.27 ^a |
| rhBMP-4m 治疗组 | 6 | 8.52 \pm 0.35 | 2.48 \pm 0.33 | 2.12 \pm 0.31 | 2.71 \pm 0.38 ^b | 3.68 \pm 0.22 ^b |

注:与正常对照组比较^a $P < 0.01$;与模型组比较^b $P < 0.05$ 。

2.2 各组小鼠骨髓单个核细胞计数比较 结果见表 2。模型组小鼠照射后各时间点骨髓单个核细胞计数均低于正常对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。照射后第 1、3 天 rhBMP-4m 治疗组小鼠骨髓

表 2 各组小鼠照射后骨髓单个核细胞计数比较

Tab.2 Comparison of the mononuclear cell count in marrow of mice in each group after irradiation ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | 单个核细胞计数/($\times 10^6 \text{ L}^{-1}$) | | | | |
|--------------|---|--|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | | 第 1 天 | 第 3 天 | 第 5 天 | 第 7 天 | 第 9 天 |
| 正常对照组 | 6 | 16.57 \pm 1.88 | 16.38 \pm 1.52 | 17.04 \pm 1.38 | 16.82 \pm 1.57 | 17.02 \pm 1.82 |
| 模型组 | 6 | 2.61 \pm 0.72 ^a | 2.16 \pm 0.33 ^a | 1.84 \pm 0.31 ^a | 2.03 \pm 0.21 ^a | 2.38 \pm 0.16 ^a |
| rhBMP-4m 治疗组 | 6 | 2.54 \pm 0.25 | 2.36 \pm 0.34 | 2.82 \pm 0.27 ^b | 4.86 \pm 0.38 ^b | 5.78 \pm 0.32 ^b |

注:与正常对照组比较^a $P < 0.01$;与模型组比较^b $P < 0.05$ 。

2.3 各组小鼠骨髓单个核细胞中 CD34⁺细胞百分率比较 结果见表 3。模型组小鼠照射后各时间点的单个核细胞中 CD34⁺细胞百分率均低于正常对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。照射后第 1、3 天 rhBMP-4m 治疗组小鼠单个核细胞中 CD34⁺细胞百

表 3 各组小鼠照射后骨髓单个核细胞中 CD34⁺细胞百分率比较

Tab.3 Comparison of the percent of CD34⁺ cells of mononuclearcell in marrow of mice in each group after irradiation ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | CD34 ⁺ 细胞百分率/% | | | | |
|--------------|---|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | | 第 1 天 | 第 3 天 | 第 5 天 | 第 7 天 | 第 9 天 |
| 正常对照组 | 6 | 7.28 \pm 0.31 | 7.12 \pm 0.45 | 7.16 \pm 0.25 | 7.23 \pm 0.28 | 7.11 \pm 0.37 |
| 模型组 | 6 | 1.07 \pm 0.18 ^a | 1.16 \pm 0.22 ^a | 2.13 \pm 0.19 ^a | 2.22 \pm 0.24 ^a | 2.35 \pm 0.32 ^a |
| rhBMP-4m 治疗组 | 6 | 1.15 \pm 0.22 | 1.26 \pm 0.31 | 2.59 \pm 0.32 ^b | 2.98 \pm 0.41 ^b | 3.28 \pm 0.47 ^b |

注:与正常对照组比较^a $P < 0.01$;与模型组比较^b $P < 0.05$ 。

学分析,数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠外周血白细胞计数比较 结果见表 1。照射后第 1 天 3 组小鼠外周血白细胞计数比较差异均无统计学意义($P > 0.05$);照射后第 3、5、7、9 天模型组小鼠外周血白细胞计数低于正常对照组,差异均有统计学意义($P < 0.01$);照射后第 3、5 天 rhBMP-4m 治疗组小鼠外周血白细胞计数与模型组比较差异均无统计学意义($P > 0.05$);照射后第 7、9 天 rhBMP-4m 治疗组小鼠外周血白细胞计数高于模型组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

髓单个核细胞计数与模型组比较差异无统计学意义($P > 0.05$);照射后第 5、7、9 天 rhBMP-4m 治疗组小鼠骨髓单个核细胞计数高于模型组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

分率与模型组比较差异无统计学意义($P > 0.05$);照射后第 5、7、9 天 rhBMP-4m 治疗组小鼠单个核细胞中 CD34⁺细胞的百分率高于模型组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

2.4 各组小鼠脾结节计数及脾体比比较 照射后第 9 天,正常对照组小鼠未见脾结节,模型组小鼠出现少量脾结节,rhBMP-4m 治疗组小鼠脾脏表面出现较多脾结节(图 1)。模型组小鼠脾结节计数高于对照组,脾体比低于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$);rhBMP-4m 治疗组小鼠脾结节计数和脾体比均高于模型组,差异有统计学意义($P<0.01$);见表 4。

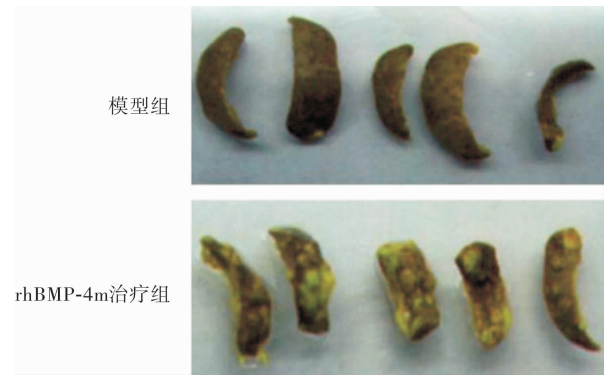


图 1 照射后第 9 天模型组和 rhBMP-4m 治疗组小鼠脾结节
Fig.1 Spleen nodus of mice in model group and rhBMP-4m treatment group on the ninth day after irradiation

表 4 各组小鼠照射后脾结节计数及脾体比比较
Tab.4 Comparison of the number of spleen nodus and spleen weight/body weight ratio of mice in each group after irradiation

| 组别 | n | 脾结节计数 | 脾体比 |
|--------------|---|---------------------------|--------------------------------|
| 正常对照组 | 6 | 0.00 ± 0.00 | 0.005 3 ± 0.000 2 |
| 模型组 | 6 | 2.38 ± 0.61 ^a | 0.001 6 ± 0.000 4 ^a |
| rhBMP-4m 治疗组 | 6 | 10.31 ± 0.38 ^b | 0.003 6 ± 0.000 7 ^b |

注:与正常对照组比较^a $P<0.05$;与模型组比较^b $P<0.01$ 。

3 讨论

造血系统对电离辐射高度敏感,受到大剂量射线照射后,造血功能会严重受损^[11],很快就可出现血细胞数量下降^[12]、造血器官器质性病变、造血干细胞和造血祖细胞损伤^[13]、造血机能极大下降,由此导致机体衰竭,易发生感染、出血等严重并发症而死亡。因此,在电离辐射对机体造成的急性损伤过程中,造血系统损伤处于病变的中心环节^[14],如不及时治疗,将产生严重后果,不仅影响预后,还会危及患者生命。

本研究结果显示,模型组小鼠白细胞数先出现短暂性升高,这可能与白细胞的迁移、黏附、动员能力及其在循环系统中分布的改变有关;继而其数目显著降低,则是因为白细胞对辐射作用较敏感,在大

剂量⁶⁰Co γ 射线照射下大量白细胞死亡的缘故^[15]。骨髓单个核细胞由于对辐射更为敏感,在照射早期即明显降低,由于照射剂量较大,其损伤、死亡较多,后期恢复也较慢。CD34 分子长期以来一直被认为是造血干细胞或造血祖细胞的表面标记分子^[16],广泛应用于造血干细胞/祖细胞的筛选。在本研究结果中,模型组小鼠骨髓单个核细胞中 CD34⁺ 数量下降明显,表明骨髓造血干细胞或造血祖细胞严重受损,造血功能明显下降。应用 rhBMP-4m 治疗后,上述各项指标随时间的推移都有较为明显的恢复。rhBMP-4m 治疗组白细胞数及骨髓单个核细胞数增长可能与 rhBMP-4m 促进造血干细胞/祖细胞分化,从而使外周血细胞池中血细胞数目增多有关;而 CD34⁺ 细胞数目增多可能与 rhBMP-4m 参与造血微环境的重建,从而有利于造血干细胞/祖细胞的存活与增殖有关。另外,脾结节被认为代表了造血干细胞,在本研究中,rhBMP-4m 治疗组小鼠脾结节数目及脾体比显著高于模型组,说明 rhBMP-4m 能够有效地促进造血干细胞/祖细胞存活,参与造血系统重建;而模型组与正常对照组相比,也有产生少量脾结节的能力,这是由于小鼠自身也存在一定的损伤修复能力,但在缺乏外在治疗干预因素的条件下,这种修复能力极为有限,不能有效促进造血系统重建。

本研究结果表明,rhBMP-4m 对大剂量电离辐射造成的急性放射损伤具有明确的修复作用,能够通过增加 CD34⁺ 细胞数,即通过上调造血干细胞/祖细胞数而促进造血系统功能恢复;BMP4 能够通过多种信号途径促进造血及造血干细胞的生成和分化^[17-20],但其具体机制仍有待深入探索。本研究为进一步研究 rhBMP-4m 在骨髓造血中的作用机制及急性放射病的临床治疗打下一定基础。

参考文献:

[1] BAMI M, MAVROGENIS A F, ANGELINI A, *et al.* Bone morphogenetic protein signaling in usculoskeletal cancer[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2016, 142(10): 2061-2072.

[2] GRGUREVIC L, CHRISTENSEN G L, SCHULZ T J, *et al.* Bone morphogenetic proteins in inflammation, glucose homeostasis and adipose tissue energy metabolism[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2016, 27(6): 105-118.

[3] COLE A E, MURRAY S S, XIAO J. Bone morphogenetic protein 4 signalling in neural stem and progenitor cells during development and after injury[J]. *Stem Cells Int*, 2016, 2016: 9260592.

[4] SALAZAR V S, GAMER L W, ROSEN V. BMP signalling in skeletal development, disease and repair[J]. *Nat Rev Endocrinol*,

2016,12(4):203-221.

[5] PEARSON S,SROCZYNSKA P,LACAUD G,*et al.* The stepwise specification of embryonic stem cells to hematopoietic fate is driven by sequential exposure to BMP4,activin A,bFGF and VEGF[J]. *Development*,2008,135 (8):1525-1535.

[6] YOON M A,HONG S J,LEE C H,*et al.* Intravoxel incoherent motion (IVIM) analysis of vertebral bone marrow changes after radiation exposure from diagnostic imaging and interventional procedures [J]. *Acta Radiol*,2017,58(10):1260-1268.

[7] FRANCO P,RAGONA R,ARCADIPANE F,*et al.* Lumbar-sacral bone marrow dose modeling for acute hematological toxicity in anal cancer patients treated with concurrent chemo-radiation[J]. *Med Oncol*,2016,33(12):137.

[8] PORT M,HERODIN F,VALENTE M,*et al.* First generation gene expression signature for early rediction of late occurring hematological acute radiation syndrome in baboons[J]. *Radiat Res*,2016,186(1):39-54.

[9] CHANG Y,YANG Z Y,LI G L,*et al.* Correlations between radiation dose in bone marrow and hematological toxicity in patients with cervical cancer: a comparison of 3DCRT, IMRT, and RapidARC [J]. *Int J Gynecol Cancer*,2016,26(4):770-776.

[10] KHURANA S,BUCKLEY S,SCHOUTEDEN S,*et al.* A novel role of BMP4 in adult hematopoietic stem and progenitor cell homing via Smad independent regulation of integrin- $\alpha 4$ expression[J]. *Blood*,2013,121(5):781-790.

[11] CHUA H L,PLETT P A,SAMPSON C H,*et al.* Long-term hematopoietic stem cell damage in a murine model of the hematopoietic syndrome of the acute radiation syndrome[J]. *Health Phys*,2012,103(4):356-366.

[12] PLETT P A,SAMPSON C H,CHUA H L,*et al.* Establishing a murine model of the hematopoietic syndrome of the acute radiation syndrome[J]. *Health Phys*,2012,103(4):343-355.

[13] CHEN S,XU Y,WANG S,*et al.* Subcutaneous administration of rhIGF-I post irradiation exposure enhances hematopoietic recovery and survival in *BALB/c* mice[J]. *J Radiat Res*,2012,53(4):581-587.

[14] GHOSH S P,KULKARNI S,PERKINS M W,*et al.* Amelioration of radiation-induced hematopoietic and gastrointestinal damage by Ex-RAD(R) in mice[J]. *J Radiat Res*,2012,53(4):526-536.

[15] BLINOVA E A,VEREMEYEVA G A,AKLEYEV A V. Apoptosis of peripheral blood lymphocytes and mutations in the gene of the T-cell receptor in survivors of chronic radiation exposure[J]. *Health Phys*,2012,103(1):58-60.

[16] FLORATOU K,GIANNOPOULOU E,ANTONACOPOULOU A,*et al.* Oxidative stress due to radiation in CD34⁺ hematopoietic progenitor cells: protection by IGF-1 [J]. *J Radiat Res*,2012,53(5):672-685.

[17] NOSTRO M C,CHENG X,KELLER G M,*et al.* Wnt, activin, and BMP signaling regulate distinct stages in the developmental pathway from embryonic stem cells to blood[J]. *Cell Stem Cell*,2008,2(1):60-71.

[18] CHOI S H,LEE J Y,SUH J S,*et al.* Dual-function synthetic peptide derived from BMP4 for highly efficient tumor targeting and antiangiogenesis[J]. *Int J Nanomedicine*,2016,13(11):4643-4656.

[19] PRAMONO A,ZAHABI A,MORISHIMA T,*et al.* Thrombopoietin induces hematopoiesis from mouse ES cells via HIF-1 α -dependent activation of a BMP4 autoregulatory loop[J]. *Ann N Y Acad Sci*,2016,1375(1):38-51.

[20] CRISAN M,SOLAIMANI KARTALAEI P,NEAGU A,*et al.* BMP and hedgehog regulate distinct AGM hematopoietic stem cells *ex vivo*[J]. *Stem Cell Reports*,2016,6(3):383-395.

(本文编辑:孟 月 英文编辑:孟 月)

《新乡医学院学报》2018 年征订启事

《新乡医学院学报》(Journal of Xinxiang Medical University)创刊于 1984 年,是新乡医学院主管主办、国内外公开发行的综合性医学学术期刊。国际标准连续出版物号:ISSN 1004-7239,国内统一连续出版物号:CN 41-1186/R。现为月刊,每月 5 日出版,大 16 开本,每期 80 页。本刊设有专家论坛、专题报告、国家自然科学基金专题评述、基础研究、临床研究、技术与方法、护理研究、综述、医学教育研究、名院·名科·名医等栏目。编辑部对来稿审理及时并严格执行“三审制”,对国家级、省部级科研基金项目资助的研究性论文优先发表。

本刊为“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊)、中国精品科技期刊、中国高校优秀科技期刊、河南省一级期刊,目前被《中国学术期刊(光盘版)全文检索数据库》、《万方数据-数字化期刊群》、美国《化学文摘》、美国《乌利希期刊指南》、英国《公共卫生数据库》(Global Health)、《中国学术期刊文摘》、《中国医学文摘》、《中国药学文摘》等国内外权威性数据库、文摘期刊收录,标志着在本刊发表的论文将有机会被国内外著名检索系统收录,这对提高作者知名度及论文的影响力不无裨益。欢迎国内外医药工作者踊跃投稿。欢迎广大订户前往当地邮局订阅,邮发代号:36-145,每期定价 10.00 元,全年 120.00 元。编辑部地址:河南省新乡市金穗大道东段新乡医学院学报编辑部,邮政编码:453003。电话:0373-3029086,传真:0373-3831371,网址:www.xxyxyxb.com,E-mail:xxyxyxb@163.com。