

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00387

高压氧对外周血造血干细胞数量影响的临床观察及实验研究

郑成刚¹, 朱亚静², 杭小华¹, 庞亚飞¹, 衣洪杰¹, 刘青乐^{1*}

1. 第二军医大学海军医学系高压氧医学中心, 上海 200433

2. 解放军第411医院麻醉科, 上海 200081

[摘要] **目的:**探讨高压氧对国人的外周血造血干细胞的影响,并通过动物实验尝试高压氧联合集落刺激因子动员外周血造血干细胞的方法。**方法:**(1)在常规的高压氧治疗方案下,观察了8例长期接受高压氧治疗的患者以及18例因神经系统损伤而接受高压氧治疗的患者在高压氧治疗前后其外周血CD34⁺细胞绝对计数的变化情况。(2)将30只BALB/c小鼠随机分成3组,每组10只。高压氧组(HBO组)接受高压氧暴露的处理;造血生长因子组(HGF组)接受注射重组造血生长因子的处理;高压氧联合造血生长因子组(HBO+HGF组)接受高压氧暴露联合注射重组造血生长因子的处理。在处理前后分别采集球后静脉血,以流式细胞仪检测设门细胞中CD34⁺/Scal-1⁺细胞的百分比。**结果:**(1)18例因神经系统损伤而接受高压氧治疗的患者经过7次高压氧治疗,外周血CD34⁺细胞绝对计数由接受高压氧治疗前的 $(1.87 \pm 1.08) \times 10^6/L$ 升高到 $(4.75 \pm 4.67) \times 10^6/L$;而经过14次高压氧治疗,患者外周血CD34⁺细胞绝对计数为 $(2.85 \pm 1.94) \times 10^6/L$;经过20次高压氧治疗,患者外周血CD34⁺细胞绝对计数为 $(3.26 \pm 3.49) \times 10^6/L$ 。8例长期接受高压氧治疗的患者其外周血CD34⁺细胞绝对计数为 $(2.11 \pm 1.14) \times 10^6/L$,与18例神经系统损伤患者未接受高压氧治疗前相比没有统计学差异。(2)HBO组、HGF组和HBO+HGF组小鼠动员后设门细胞中CD34⁺/Scal-1⁺细胞的百分比分别是动员前的2.01倍、2.66倍和3.76倍。**结论:**高压氧治疗可以动员外周血造血干细胞,但长期高压氧暴露不能使外周血CD34⁺细胞绝对计数保持在较高水平。高压氧联合造血生长因子能够更加有效地动员外周血造血干细胞。

[关键词] 高压氧;外周血;造血干细胞;动员

[中图分类号] R 456 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)04-0387-04

Effect of hyperbaric oxygen on number of peripheral blood stem cells: clinical observation and experimental study

ZHENG Cheng-gang¹, ZHU Ya-jing², HANG Xiao-hua¹, PANG Ya-fei¹, YI Hong-jie¹, LIU Qing-le^{1*}

1. Hyperbaric Oxygen Medical Center, Faculty of Naval Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Anesthesia, No. 411 Hospital of PLA, Shanghai 200081

[ABSTRACT] **Objective:** To observe the effect of hyperbaric oxygen (HBO) on peripheral hematopoietic stem cells (PHSCs) in a Chinese population, and to mobilize PHSCs by combined use of HBO and colony-stimulating factor (CSF) in an animal experiment. **Methods:** (1) The changes of CD34⁺ absolute count before and after HBO therapy were observed under routine HBO conditions in 8 patients who received long-term HBO therapy and 18 patients who received HBO therapy for neurological injuries. (2) Thirty BALB/c mice were equally randomized into three groups; HBO group, where the animals were exposed to HBO; HGF group, where the animals received recombinant hematopoietic growth factor injection; and HBO+HGF group. Postglobe venous blood was harvested before and after treatment; the gated cell CD34/Scal-1 dual-positive population was determined by flow cytometry. **Results:** (1) After 7 episodes of HBO therapies, the peripheral CD34⁺ absolute count of the patients rose from $(1.87 \pm 1.08) \times 10^6/L$ before treatment to $(4.75 \pm 4.67) \times 10^6/L$ (an increase of 2.54 folds); while the number was $(2.85 \pm 1.94) \times 10^6/L$ after 14 episodes of HBO therapies (with an increase of 1.52 folds) and $(3.26 \pm 3.49) \times 10^6/L$ after 20 episodes of HBO therapies (with a increase of 1.74 folds). The peripheral CD34⁺ absolute count of the 8 patients who received long-term HBO therapy for neurological injuries was $(2.11 \pm 1.14) \times 10^6/L$, not significantly different from that of the 18 patients before treatment. (2) The gated cell CD34/Scal-1 dual-positive population in HBO group, HGF

[收稿日期] 2008-07-23 **[接受日期]** 2008-12-04

[基金项目] 第二军医大学海医系青年启动基金(2006QNK05). Supported by Startup Fund for Young Scientists of the Faculty of Naval Medicine, Second Military Medical University(2006QNK05).

[作者简介] 郑成刚, 硕士, 讲师、主治医师. E-mail: jingbaniuniu@163.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81871165, E-mail: qlliuw@126.com

group, and HBO+HGF group after treatment were 2.01, 2.66, and 3.76 folds before treatment, respectively. **Conclusion:** Multiple HBO exposure can mobilize PHSC; prolonged HBO exposure fails to maintain the peripheral CD34⁺ absolute count at a relatively high level. Concomitant use of HBO and HFG can more effectively mobilize PHSCs.

[KEY WORDS] hyperbaric oxygenation; peripheral blood; hematopoietic stem cell; mobilization

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(4): 387-390]

国外有文献^[1]报道,高压氧能动员外周血造血干细胞。通过高压氧暴露,能够增加内皮祖细胞(EPC)从骨髓到外周血的动员,增加的EPC包括在CD34⁺细胞亚群中^[2]。EPC被认为在血管的新生和创伤的愈合中起重要作用,但是生理性的EPC动员对于存在严重缺血的创伤完全愈合往往是不够的。目前造血干细胞移植被用来治疗下肢动脉硬化闭塞,其依据就是在移植局部提供EPC和移植细胞在局部释放多种血管生成因子如血管内皮细胞生长因子(VEGF)等^[3]。研究^[4]显示在糖尿病情况下骨髓中内皮型一氧化氮合酶的磷酸化受损,循环中EPC减少;同时受损表皮处的基质细胞衍生因子-1 α (SDF-1 α)表达降低,SDF-1 α 是一个趋化因子以调节EPC向缺血灶处聚集。高压氧逆转了糖尿病情况下EPC动员的减少,SDF-1 α 逆转了EPC向缺血灶处聚集障碍。应用高压氧治疗可以加速糖尿病、外周动脉疾病(PAD)导致的难治性、慢性创伤的愈合^[5]。

我中心在2006年11月至2007年12月期间观察了8例长期高压氧治疗的神经系统损伤患者的外周血造血干细胞水平,以及18例因为神经系统损伤而接受高压氧治疗的患者在治疗前后外周血造血干细胞绝对计数的变化情况;并通过动物实验探讨高压氧联合集落刺激因子能否更加有效地动员外周血造血干细胞,为高压氧应用于造血干细胞的动员提供依据。

1 资料和方法

1.1 临床观察

1.1.1 病例资料 中枢神经系统损伤患者18例,男性13例,女性5例,年龄9~48岁,平均(33.1 \pm 10.7)岁。其中脑外伤患者10例,脊髓损伤患者8例。入选标准:(1)具备接受高压氧治疗的适应证;(2)此前未接受过高压氧治疗;(3)此前未接受过放疗与化疗;(4)近期无感染,未使用抗生素;(5)近期未使用皮质类固醇激素、镇静安眠药物、抗癫痫药物等影响造血系统的药物;且在治疗前与治疗过程中所用其他药物一致;(6)连续接受高压氧治疗20次以上。

长期接受高压氧治疗的患者8例,其中男5例,女3例;年龄23~43岁,平均(34 \pm 6.6)岁;脑外伤2

例,脊髓损伤2例,心肺复苏后2例,一氧化碳中毒1例,有机磷农药中毒1例。高压氧治疗51~173次,平均(109 \pm 51)次。入选标准:(1)连续接受高压氧治疗50次以上;(2)此前未接受过放疗与化疗;(3)近期无感染;(4)近期未使用皮质类固醇激素、抗癫痫药物、镇静安眠药物等影响造血系统的药物。

1.1.2 高压氧治疗方案 采用压缩空气加压,升压时间15 min,压力为2.2绝对压(atmospheres absolute, ATA),稳压时间每次吸氧20 min,共4次,两次吸氧之间间歇5 min,减压时间20 min。以上治疗每日1次。

1.1.3 白细胞总数及CD34⁺细胞的检测 对于18例神经系统损伤患者,在高压氧治疗前以及第1、7、14、20次高压氧治疗后采集外周血标本;对于长期接受高压氧治疗的患者在同1 d分别采集1次外周血标本。血标本进行血常规检测,计算白细胞总数;同时用FACACalibur流式细胞仪(美国BD公司产)检测CD34⁺细胞比例,计算CD34⁺细胞绝对计数。

1.1.4 统计学处理 18例神经系统损伤患者在高压氧治疗前后不同时间外周血CD34⁺细胞绝对计数的比较首先用SAS软件单因素重复测量方差分析;再使用SAS软件随机区组方差分析,并用SNK法进行两两比较。8例长期接受高压氧治疗的患者和18例未接受过高压氧治疗的神经系统损伤患者的外周血CD34⁺细胞绝对计数之间的比较使用SAS软件 t 检验进行分析。

1.2 动物实验

1.2.1 实验动物与分组 健康雄性BALB/c小鼠30只,体质量(20.46 \pm 1.89)g,清洁级,由第二军医大学实验动物中心提供。动物按体质量采用随机数字法随机分为3组,每组10只:高压氧组(HBO组)、造血生长因子组(HGF组)和高压氧联合造血生长因子组(HBO+HGF组)。HBO组小鼠接受HBO暴露以动员外周血造血干细胞;HGF组小鼠按照10 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 的剂量给予重组人粒细胞集落刺激因子[rhG-CSF, 惠尔血,麒麟鲲鹏(中国)生物药业有限公司生产,75 $\mu\text{g}/\text{支}$]注射,每日1次,连续2 d,以动员外周血造血干细胞。HBO+HGF组小鼠在按照上述剂量注射rhG-CSF的同时,接受HBO的暴露以动员外周血造血干细胞。

1.2.2 高压氧暴露方法 将 HBO 组以及 HBO+HGF 组动物分别置于动物加压舱(上海杨园氧舱厂)内,舱底放置钠石灰,用纯氧洗舱,测氧仪(CY12C 型,浙江杭州梅城电化分析仪器厂生产)测得舱内氧浓度 $>97.1\%$ 时,开始以 $0.02\text{ MPa}/\text{min}$ 的速度加压至 0.18 MPa ,使舱内氧浓度 $>98\%$,二氧化碳浓度 $<0.05\%$,高压下停留 90 min ,暴露结束以后匀速减压, 15 min 减至常压出舱。每日 1 次,连续暴露 2 d。

1.2.3 设门细胞中 $\text{CD}34^+/\text{Scal-1}^+$ 细胞百分比的检测 在动员开始以前及动员结束以后分别采集小鼠球后静脉血,采集的血标本分别与荧光标记的 $\text{CD}34$ 抗体(美国 BD 公司)、 Scal-1 抗体(美国 BD 公司)混合,用 FACACalibur 流式细胞仪(美国 BD 公司)检测设门细胞中 $\text{CD}34^+/\text{Scal-1}^+$ 细胞的百分比。

1.2.4 统计学处理 3 组小鼠在动员前后设门细胞中 $\text{CD}34^+/\text{Scal-1}^+$ 细胞的百分比的比较使采用 SAS 软件进行两因素多水平重复测量方差分析。

2 结果

2.1 HBO 对国人外周血 $\text{CD}34^+$ 细胞绝对计数的影响 所有观察对象外周血白细胞总数在高压氧暴露前后没有显著改变。18 例因神经系统损伤而接受高压氧治疗的患者在接受高压氧治疗之前外周血 $\text{CD}34^+$ 细胞的绝对计数为 $(1.87 \pm 1.08) \times 10^6/\text{L}$,在接受 1、7、14、20 次高压氧治疗之后其外周血 $\text{CD}34^+$ 细胞的绝对计数分别为 $(2.28 \pm 1.03) \times 10^6/\text{L}$ 、 $(4.75 \pm 4.67) \times 10^6/\text{L}$ 、 $(2.85 \pm 1.94) \times 10^6/\text{L}$ 、 $(3.26 \pm 3.49) \times 10^6/\text{L}$ 。单因素重复测量方差分析($F=3.99, P=0.0057$)提示接受高压氧治疗以后,患者外周血 $\text{CD}34^+$ 细胞绝对计数有升高;随机区组方差分析($F=3.33, P<0.0001$)提示不同治疗时间后患者外周血 $\text{CD}34^+$ 细胞绝对计数有统计学差异;采用 SNK 法进行两两比较后发现,经过 7 次、14 次和 20 次高压氧治疗后外周血 $\text{CD}34^+$ 细胞绝对计数与其他时间相比有升高,分别是接受治疗前的 2.54 倍、1.52 倍和 1.74 倍,而治疗前与 1 次治疗后相比无统计学差异,7 次治疗后、14 次治疗后、20 次治疗后相比亦无统计学差异。

8 例长期接受高压氧治疗的患者外周血中 $\text{CD}34^+$ 细胞的绝对计数为 $(2.11 \pm 1.14) \times 10^6/\text{L}$;18 例因神经系统损伤而接受高压氧治疗的患者在接受高压氧治疗之前外周血中 $\text{CD}34^+$ 细胞的绝对计数为 $(1.87 \pm 1.08) \times 10^6/\text{L}$ 。8 例长期接受高压氧治疗患者的外周血 $\text{CD}34^+$ 细胞绝对计数与 18 例未接受

过高压氧治疗患者的外周血 $\text{CD}34^+$ 细胞绝对计数无统计学差异(方差齐性检验 $F=1.10, P=0.8110$; $t=0.50, P=0.6207$)。

2.2 HBO 对实验动物外周血造血干细胞的影响

HBO 组小鼠在接受 HBO 暴露前后设门细胞中 $\text{CD}34^+/\text{Scal-1}^+$ 细胞的比例,暴露前为 $(0.237 \pm 0.156)\%$,暴露后为 $(0.477 \pm 0.271)\%$,是暴露前的 2.01 倍;HGF 组小鼠在注射集落刺激因子动员外周血造血干细胞前后设门细胞中 $\text{CD}34^+/\text{Scal-1}^+$ 细胞的比例,注射前为 $(1.554 \pm 1.347)\%$,注射后为 $(4.133 \pm 2.005)\%$,是注射前的 2.66 倍;HBO+HGF 组在动员前后设门细胞中 $\text{CD}34^+/\text{Scal-1}^+$ 细胞的比例,动员前为 $(1.148 \pm 0.496)\%$,动员后为 $(4.311 \pm 1.004)\%$,是动员前的 3.76 倍。上述结果用 SAS 软件进行两因素多水平重复测量方差分析,处理前后的差别分析($F=31.64, P<0.0001$)提示不同处理前后的差异有统计学意义,说明 3 种动员方法均能有效动员外周血造血干细胞;3 组间差别的多元方差分析($F=51.91, P<0.0001$)有统计学意义,因而进一步分析不同组之间差异($F=10.41, P=0.0004$),提示高压氧联合集落刺激因子能够更加有效地动员外周血造血干细胞。

3 讨论

研究^[6]表明由干/祖细胞的乳酸盐代谢产生的氧化应激加速了干/祖细胞的进一步募集和分化,具体则是通过硫氧还原蛋白-1(Trx-1)介导的低氧诱导因子-1(HIF-1)水平的升高以及 HIF-1 依赖的生长因子后续合成来实现的。若通过适当次数的高压氧暴露即能有效动员外周血造血干细胞,将对目前移植治疗中干细胞的采集方法产生重要的影响。

本研究通过临床观察和统计学分析发现,经过 7 次、14 次和 20 次的高压氧治疗,患者外周血 $\text{CD}34^+$ 细胞绝对计数分别较接受治疗之前升高到原来的 2.54 倍、1.52 倍和 1.74 倍;而长期高压氧暴露不能使外周血 $\text{CD}34^+$ 细胞绝对计数保持在较高水平。与国外研究^[1]结果相比,本研究在外周血 $\text{CD}34^+$ 细胞绝对计数升高的时间、升高的幅度等方面存在较大差别。首先,我们观察到经过 7 次高压氧治疗之后,患者外周血 $\text{CD}34^+$ 细胞绝对计数就已经达到一个峰值,随着暴露次数的增加,外周血 $\text{CD}34^+$ 细胞绝对计数有所下降,但与接受治疗前相比仍维持升高状态;而国外文献^[1]报道,经过 20 次高压氧治疗,患者外周血 $\text{CD}34^+$ 细胞绝对计数呈逐步升高的趋势,在 20 次高压氧治疗后,外周血 $\text{CD}34^+$ 细胞绝对计数为治

疗前的8倍。其次,我们观察到高压氧虽然能够动员外周造血干细胞,但外周血 CD34⁺ 细胞绝对计数升高的幅度远不如国外文献报道,经过7次高压氧治疗后,患者外周血 CD34⁺ 细胞绝对计数是治疗前的2.54倍;而国外文献^[1]报道20次高压氧治疗之后,患者外周血 CD34⁺ 细胞绝对计数升高8倍。

造成上述差别的主要原因:一是 Thom 等^[1]所观察的病例主要是因头颈部肿瘤而接受放疗的患者,接受预防性高压氧治疗是为了防止放射性骨坏死的发生,以消除放射治疗的不良反应。而文献^[7]报道低剂量辐射能够促进外周造血干细胞的动员。高压氧与小剂量射线照射二者叠加则应更能促进外周造血干细胞的动员。而我们所观察的病例主要是因中枢神经系统损伤而接受高压氧治疗的患者,这些患者均未曾接受过射线照射。二是种族差异,高压氧暴露以后国人外周血 CD34⁺ 细胞绝对计数升高的时间、幅度是否与西方人不同,也有待进一步研究。

我们还观察到,国人之间由于个体差异,高压氧暴露以后外周血 CD34⁺ 细胞绝对计数变化的情况可能也不尽相同。前期临床观察所收集的病例中确有部分患者如国外文献^[1]报道,在经过若干次高压氧暴露以后,外周造血干细胞绝对计数升高了8倍左右,且与其他后续患者相比较在病情、用药等方面无差异^[8]。可能的原因一是个体差异;二是早期样本例数较少,随着病例的不断积累,可能出现不同的观察结果。

本研究还发现,长期的高压氧暴露不能使外周血 CD34⁺ 细胞绝对计数保持在较高水平。这一现象的具体机制目前尚不十分清楚,我们推测可能是在高压氧暴露后刺激了体内 NO 的合成,随着 NO 合成增加外周造血干细胞的动员增加,继续进行高压氧暴露后,机体逐渐出现耐受,进而适应了高压氧暴露的刺激,NO 合成逐渐减少,水平下降,外周造血干细胞的动员从而减少。

通过动物实验我们证实高压氧、造血生长因子以及高压氧联合造血生长因子均能有效动员外周造血干细胞,高压氧联合造血生长因子动员效果更加理想,通过连续2d的高压氧暴露和造血生长因子注射,小鼠外周血设门细胞中 CD34⁺/Sca1-1⁺ 细胞的比例是动员前的3.76倍。目前造血干细胞移植已被广泛应用于临床,用于治疗血液病、恶性肿瘤、下肢动脉硬化闭塞等疾病,而移植成功与否的关键在于造血干细胞的数量和质量,故临床上在移植之

前广泛采用集落刺激因子或化疗联合集落刺激因子来动员造血干细胞,有报道^[9]粒细胞集落刺激因子(G-CSF)与粒-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)单用及合用均能有效动员外周造血干细胞。我们的动物实验证实使用集落刺激因子联合高压氧能够更加有效地动员造血干细胞,动员效果好,为将高压氧用于临床造血干细胞的动员提供了实验依据。

[参考文献]

- [1] Thom S R, Bhopale V M, Velazquez O C, Goldstein L J, Thom L H, Buerk D G. Stem cell mobilization by hyperbaric oxygen[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 290: H1378-H1386.
- [2] Goldstein L J, Gallagher K A, Bauer S M, Bauer R J, Baireddy V, Liu Z J, et al. Endothelial progenitor cell release into circulation is triggered by hyperoxia-induced increases in bone marrow nitric oxide[J]. *Stem Cells*, 2006, 24: 2309-2318.
- [3] 董国祥. 造血干细胞移植在慢性下肢缺血治疗中的意义和发展前景[J]. *中国实用外科杂志*, 2005, 25: 241-242.
- [4] Gallagher K A, Liu Z J, Xiao M, Chen H, Goldstein L J, Buerk D G, et al. Diabetic impairments in NO-mediated endothelial progenitor cell mobilization and homing are reversed by hyperoxia and SDF-1 alpha[J]. *J Clin Invest*, 2007, 117: 1249-1259.
- [5] Gallagher K A, Goldstein L J, Thom S R, Velazquez O C. Hyperbaric oxygen and bone marrow-derived endothelial progenitor cells in diabetic wound healing[J]. *Vascular*, 2006, 14: 328-337.
- [6] Milovanova T N, Bhopale V M, Sorokina E M, Moore J S, Hunt T K, Hauer-Jensen M, et al. Lactate stimulates vasculogenic stem cells *via* the thioredoxin system and engages an autocrine activation loop involving hypoxia-inducible factor 1[J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28: 6248-6261.
- [7] 王冠军, 谭业辉, 张福明, 李薇, 杨丽云, 马俐君. 低剂量辐射对造血系统兴奋效应的研究[J]. *中华血液学杂志*, 2001, 22: 232-234.
- [8] 郑成刚, 朱亚静, 杭小华, 庞亚飞, 钱文慧, 赵黎明, 等. 高压氧动员外周造血干细胞的初步临床观察[J]. *第二军医大学学报*, 2007, 28: 1038-1039.
Zheng C G, Zhu Y J, Hang X H, Pang Y F, Qian W H, Zhao L M, et al. Peripheral blood stem cell mobilization by hyperbaric oxygen: a clinical observation[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2007, 28: 1038-1039.
- [9] 章卫平, 王健民, 童书鹏, 宋献民, 钱宝华, 周虹, 等. 健康供者外周造血干细胞动员的临床研究[J]. *第二军医大学学报*, 2002, 23: 939-942.
Zhang W P, Wang J M, Tong S P, Song X M, Qian B H, Zhou H, et al. Clinical study on peripheral blood stem cell mobilization in normal donors[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2002, 23: 939-942.

[本文编辑] 孙岩