放射损伤小鼠血清抑制造血机制研究

蒲晓允* 罗成基** 潘 静 陈晓莉 李招权 邓 均 张 良 (第三军医大学医学检验系临床检验学教研室) 重庆, 400038

提 要 目的: 探讨放射损伤后骨髓造血功能衰竭的机制,为重建造血功能提供理论依据。方法: 检测昆明种雄性小鼠经 6 Gy ^{60}Coγ 射线照射后血清对 CFU-E和 CFU-GM 的支持和抑制活性,用放免和 ELISA法分别检测血清中 TNF-α 和 TGF-β$_1$ 的含量。结果: ① 照射后小鼠血清对 CFU-E的支持活性降低,但对 CFU-GM的支持活性增强; ② 血清对刺激因子诱导的 CFU-E和 CFU-GM均有显著的抑制活性; ③ 血清经灭活后抑制活性降低; ④ 放射损伤后血清 TNF-α 在 1、3 d降低, 7、15 d恢复到正常水平; TGF-β$_1$ 在 1、3 d显著升高, 15 d降低。结论: 放射损伤后血清对血细胞的生成具有细胞刺激因子依赖性抑制作用,血清的造血抑制作用与血清中抑制因子水平及细胞毒作用有关。

关键词 造血抑制;放射损伤;血清
中图法分类号 R818.74

放射损伤后将导致机体造血功能的不同程度减退,以往认为主要与放射对造血细胞、尤其是对造血干细胞的直接损伤和造血微环境的破坏有关。目前放射损伤后细胞因子表达的异常已引起了很多学者的关注,并发现有刺激因子表达的异常,但对抑制因子研究较少,为了探讨这一问题,我们进行了该项研究。

1 材料与方法

1.1 实验动物

昆明种雄性小鼠 90只 (本校动物所提供),随机分为对照组、照射 1、3、7、15 d组,其中对照组 10只,每个时相点各 20只。

1.2 照射条件

^{60}Coγ 射线全身一次性照射 6 Gy,剂量率 1.143~1.211 Gy/min。照射后小鼠在预定的时间从股动脉放血,收集血清,放 -20℃保存备用。

1.3 骨髓粒单祖细胞 (CFU-GM)培养

体系: 马血清 25%,小鼠肌浸液 10%,骨髓有核细胞 1×10^5/ml,不同浓度及时间收集的血清,甲基纤维素,充分混匀后分装于 35 mm培养皿,1 ml/皿,放入 37℃ 5% CO_2孵箱中,7 d后低倍镜计数 CFU-GM集落,以大于 50个细胞组成的细胞团作为一个集落。

1.4 红系祖细胞 (CFU-E)培养

按刘秀珍[1]报道的方法进行。

1.5 细胞计数及分类计数

白细胞及血小板计数采用目视计数法,分类采用 Wright's 染色。

1.6 血清 TNF-α 和 TGF-β$_1$ 检测

按 TNF-α 放免试剂盒 (购于北京军事医学科学院)和 TGF-β$_1$ ELISA试剂盒 (美国 Genzyme公司产品)说明书要求进行检测。

1.7 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$表示,以 t检验分析组间差异的显著性。

2 结果

2.1 照射后血清浓度对 CFU-E和 CFU-GM的影响

以未照射小鼠血清作为对照组,照射后 3 d血清为实验组,在不加外源性刺激条件下观察血清对 CFU-E和 CFU-GM的刺激活性。结果对照组和放射损伤后血清都具有一定的造血支持活性,且随血清浓度的增加,支持能力增强。但与对照组比较,照射后血清对 CFU-E的刺激活性降低,而对 CFU-GM刺激活性明显升高,每皿或每孔 CFU-GM和 CFU-E集落数见表 1。

表 1 放射损伤后血清浓度对 CFU-E和 CFU-GM的影响

Tab 1 The effect of serum concentration on CFU-E and CFU-GM after radiation injury

Concentration of serum (%)	Control		3 d	
	CFU-E	CFU-GM	CFU-E	CFU-GM
1	2.14±1.20	2.32±2.41	1.21±1.20	2.01±1.81
5	3.65±1.17	28.45±2.71	2.32±1.31	32.17±4.12
10	6.33±1.62	36.31±6.31	2.07±1.15△	72.15±6.83△△
15	6.17±1.01	60.27±8.18	3.01±1.21△	83.41±9.16△△
20	7.31±1.84	64.32±7.31	3.75±1.31△	109.17±6.54△△

△: $P<0.05$, △△: $P<0.01$ *vs* control

2.2 照射后血清及其灭活后对 CFU-E和 CFU-GM的抑制活性

在加入外源性刺激因子 (CFU-E和 CFU-GM分别加入 1 u/ml EPO和 10%肌浸液)条件下,培养体系中加入 10%照射后和未照射小鼠血清。结果未照射小鼠血清无明显的抑制活性,而照射后血清显示较强抑制活性,其中对 CFU-GM的抑制活性较高于 CFU-E的抑制活性;在照射后不同时间,以第 3天的血清抑制活性最强,血清经灭活后抑制活性降低,见表 2。

* 蒲晓允,男,36岁,讲师,博士研究生
** 预防医学系防原医学教研室、全军复合伤研究所 重庆, 400038

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 2 放射损伤后血清对 CFU-E和 CFU-GM的抑制活性

Tab 2 The inhibiting activity of serum on CFU-E and CFU-GM after radiation injury

Colony		Control	Serum+ control	Control+ 10% irradiated serum			
				1 d	3 d	7 d	15 d
CFU-E	BI	31.45± 4.76	29.12± 3.17	21.44± 4.03##	18.11± 3.18##	21.22± 4.60##	26.66± 5.60
	AI	30.24± 3.67	29.01± 2.54	24.15± 2.73*	26.31± 3.50*	21.25± 3.43	27.11± 4.22
CFU-GM	BI	312.43± 43.00	298.31± 31.70	245.13± 25.45##	235.16± 33.29##	217.14± 24.73##	262.16± 37.49##
	AI	297.63± 41.13	291.43± 25.37	264.50± 40.53*	257.71± 28.25*	257.42± 18.43**	270.50± 36.95*

BI: Before inactivation, AI: After inactivation; ##: $P<0.01$ *vs* control; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* BI

2.3 照射后血清 TNF-α和 TGF-β1水平的变化

血清中 TNF-α水平在放射损伤后第 1天和第 3天明显低于对照组,第 7天后达正常水平。TGF-β1于放射损伤后第 1天、第 3天明显高于对照组,第 7天与对照组相当,但第 15天则低于对照组。TNF-α先降低后回升,而 TGF-β1先升高后降低的变化见表 3。

表 3 放射损伤后血清 TNF-α和 TGF-β1的变化

Tab 3 Changes of serum TNF-α and TGF-β1 after radiation injury

	Control	1 d	3 d	7 d	15 d
TNF-α(ρ_B/ng·ml^{-1})	1.84± 0.19	1.35± 0.12*	1.11± 0.13*	1.89± 0.20	2.02± 0.14
TGF-β1(ρ_B/ng·ml^{-1})	99.5± 10.21	118.75± 9.34*	122.25± 11.21*	98.75± 8.43	81.25± 6.17*

*: $P<0.05$ *vs* control

2.4 外周血细胞数与血清抑制活性的关系

在外周血白细胞总数(WBC)、单核细胞(MC)、中性粒细胞(GC)、淋巴细胞(LC)及血小板(BPC)中,BPC先升高,后逐渐降低,其它细胞均先降低,第 7天时最低,第 15天时回升,这种变化与血清对 CFU-E和 CFU-GM的抑制率相似,见表 4。

表 4 放射损伤后小鼠外周血细胞数量及抑制率的改变

Tab 4 Changes of blood cells and inhibiting rate after radiation injury

Cells	Control	1 d	3 d	7 d	15 d
BPC(×10^9/L)	333.75± 32.26	444.67± 86.25*	591.33± 87.69**	371.71± 59.69	271.71± 48.63*
WBC(×10^9/L)	6.68± 0.97	2.63± 0.34**	1.57± 0.45**	0.87± 0.16**	1.18± 0.20**
MC(×10^6/L)	931.27± 121.5	112.34± 0.71**	20.45± 5.71**	7.52± 1.33**	14.35± 6.27**
GC(×10^9/L)	4.25± 0.29	1.87± 0.17	1.12± 0.11	0.48± 0.05**	0.56± 0.04**
LC(×10^9/L)	4.46± 0.33	1.35± 0.22**	0.68± 0.08**	0.40± 0.05**	0.17± 0.04**
IR-1	7.23	31.82	42.42	32.52	15.23
IR-2	5.41	21.54	24.23	30.49	16.09

IR-1: Inhibiting rate of CFU-E, IR-2 Inhibiting rate of CFU-GM; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control

3 讨论

血细胞的生成主要受两方面因素的调控:一是促进血细胞增殖的刺激因素,这方面已有很多报道;另一方面是阻止血细胞增殖分化的抑制因素,由于种种原因这方面的研究相对滞后。这两种因素在体内同时存在,但在不同条件下,它们所起作用的大小不同。对增殖细胞而言,如果刺激因素占主导则细胞的增殖加速,生成的细胞增多;反之则细胞生成减少。由于不同的骨髓细胞对放射的敏感性不同[2],因此在急性损伤期和恢复期,骨髓中细胞的组成或细胞之间的比例与生理条件时都有很大差异[3],这种差异将导致细胞间相互作用方式或细胞因子表达的种类和水平的改变,从而使骨髓的造血异常。本实验结果提示:放射后小鼠血清对造血祖细胞的支持能力与祖细胞的种类有关:对 CFU-E的刺激活性降低,但对 CFU-GM的刺激活性反较放射前增强,活性提高 30%左右。这可能与照射后机体的 IL-1释放增加[4],从而促进刺激粒细胞的某

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

些细胞因子表达有关,但照射后血清对 CFU-E支持能力降低的具体机制目前尚不清楚。

实验结果也提示:放射后血清无论对 CFU-E还是 CFU-GM均有较强的抑制活性,这一结果与我们预期的结果间存在一定距离,因为虽然放射后小鼠血清对 CFU-GM的刺激活性增加,但生成的集落并非是血清刺激活性与外加刺激因素的叠加,而表现出对 CFU-GM和 CFU-E的抑制活性,由于其抑制活性是在外加刺激因子(EPO和肌浸液)后才出现的,因此提示这种抑制是刺激因子依赖性的,即无刺激因子存在时血清具有一定的刺激活性,当有刺激因子存在时血清表现出抑制活性,这是多种细胞抑制因子对血细胞抑制的共同特点[5],表明放射损伤后血清的造血抑制活性与某些抑制因子表达有关。检测结果提示,对细胞的增殖具有最强抑制作用的 TGFβ1水平,在放射损伤后的 7 d内是显著升高的,在第 15天时反而降低,这与外周血中白细胞总数的变化相反,而与血清抑制活性的变化相一致;与此同时血清中另一种造血抑制因子 TNFα水平的变化却与血清的抑制活性无平行关系,其原因尚不清楚。最近徐辉[6]在观察被放射损伤后小鼠小肠淋巴细胞功能时发现,小肠淋巴细胞表达 TGFβ1水平也显著升高。是否可以认为 TGFβ1是血清中造血抑制活性的主要因素,还有待进一步证实。

血清经灭活后对 CFU-E和 CFU-GM的抑制活性均降低,表明抑制活性还有细胞毒作用的参与,细胞毒作用可能与放射引起多种细胞的直接损伤,使细胞内酶的释放[7]导致细胞损伤有关。本结果提示照射后小鼠外周血中的白细胞总数、单核细胞、淋巴细胞数在不同时相点的变化与血清对 CFU-E和 CFU-GM的抑制率变化呈平行关系,提示这些血细胞的减少除与放射线对细胞的直接损伤有关外,还与血清的造血抑制活性改变有关,这为我们进一步从造血抑制因素方面研究放射损伤后血细胞减少的成因是一个有益的提示。

参考文献

1 刘秀珍.造血细胞培养技术实验手册.北京:北京出版社,1993. 102~ 105

2 Yamazaki K, Auen T D. Ultrastructural and morphometric alteration in bone marrow stromal tissue after 7 Gy irradiation. Blood cells, 1991,(3): 527

3 Lutton J D, Cherov J L, Jiong S, *et al*. Synergistic effect of heme and IL-1 on hematopoietic stromal regeneration after radiation. Am J Hematol, 1993, 44(3): 172

4 Teixido J, Hemler M, Greenberger J, *et al*. Role of B_1 and B_2 integrin in the adhesion of human CD_{34}+ stem cells to bone marrow stroma. J Clin Invest, 1992, 90(3): 358

5 Broxmeyer H E, Sherry B, Cooper S, *et al*. Comparative analysis of the human macrophage inflammatory protein family of cytokines on proliferation of human myeloid progenitor cells. J Immunol, 1993, 150(8): 3448

6 徐　辉,程天民,粟永萍,等.小鼠全身辐射后小肠上皮淋巴细胞形态及功能的影响.第三军医大学学报, 1998, 20(4): 281

7 Sun J, Chen Y, Ge Z. Role of antioxidant enzymes on ionizing radiation resistance. Free Radic Biol Med, 1998, 24(4): 586

(收稿: 1998-10-03;修回: 1999-04-27)

(编辑　冷怀明)

Study of the mechanism of hematopoietic inhibition after radiation injury in mice

Pu Xiaoyun, Luo Chengji, Pan Jing, Cheng Xiaoli, Li Zhaoquan, Deng Jun, Zhang Liang (Faculty of Medical Laboratory Technology, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract **Objective**: To study the pathological mechanism of hematopoietic failure of the bone marrow after radiation injury in mice. **Methods**: Mice of Kunming strain were irradiated with whole body gamma rays from ^{60}Co in the dosage of 6 Gy. The CFU-E and CFU-GM supported hematopoietic function of the serum was determined on the 1st, 2nd, 3rd and 15th day after irradiation and the serum content of TNF-α and TGF-β1 was also measured with radioimmunoassay and ELISA respectively. **Results**: ① The serum hematopoietic activity in the irradiated mice was decreased in CFU-E supported samples but increased in CFU-GM supported ones. ② The serum exerted marked inhibition on CFU-GM and CFU-E and this inhibition was decreased if the serum was inactivated. ③ The serum content of TNF-α was decreased and that of TGFβ1 increased in the irradiated mice. **Conclusion**: The irradiated murine serum exerted marked cytokine-dependent inhibition on the hematopoietic activity and the hematopoietic inhibition of the serum was related to the content of the inhibitory factors and the cytotoxicity in the serum.

Key words serum; hematopoietic inhibition; radiation injury; mouse

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net