

· 综述与编译 ·

造血基质祖细胞的辐射敏感性研究进展

白求恩医科大学 于洪臣 王立华综述 刘 及审校

摘 要:综述了几种动物的造血基质祖细胞在体外培养下的辐射敏感性及其主要影响因素。根据文献和本室工作资料,展望了此类细胞的科学意义及其发展前景。

造血组织的辐射损伤主要取决于造血干细胞的损伤^[1],但参与调节的基质的损伤也对造血的修复起着重要作用^[2-5]。近年来发现,它不仅是维持正常造血与免疫功能的重要成分,而且对其它器官,如骨、结缔组织和各类肿瘤等疾病的发生、发展和治疗也可发挥其特殊作用^[6-10]。本文对其辐射敏感性等有关问题做一综述,以深入研究其科学意义及在机体发病与治疗中应用的可能性及其发展前景。

1 造血基质祖细胞

造血基质祖细胞(HSPC)又称成纤维集落(克隆)形成单位(CFU-F),它们能分化和增殖为成熟的造血基质细胞。在体外培养时能形成成纤维样细胞集落,也称造血微环境基质祖细胞。它在正常时处于静态细胞,但在造血组织损伤或受激发时,便进入细胞周期而增殖,分化为各种终末阶段的基质细胞,其中包括成骨细胞、破骨细胞、脂肪细胞、组织巨噬细胞、网状内皮细胞和成纤维细胞等,执行其各自的功能。这些细胞总称为细胞性造血基质。在造血组织中尚有非细胞性基质,也称细胞外基质,如血管细胞粘分子-1(VCAM-1)、整合蛋白、纤维连接蛋白、层粘蛋白、各种细胞因子(Cytokines),粘多糖类(包括透明质酸、硫酸软骨质、蛋白多糖等)^[11]、胶原蛋白、谷胱甘肽、维生素等。它们大部分是基质细胞或造血细胞产生的,为支持、营养、调控各类造血细胞的分化与增殖、抵御细胞损伤发挥重要作用。因此,学者们越来越重视包括基质细胞的辐射敏

感性及其影响因素的研究,而且也日益重视其功能活动的分子机理的探索工作^[12]。

1.1 造血基质祖细胞的辐射敏感性

Копесникова等^[13]研究了大鼠骨髓基质祖细胞克隆条件,在体外液体单层培养中形成致密和疏松成纤维细胞集落(CFU-F)。大鼠骨髓CFU-F的剂量存活曲线为肩区不大的S型曲线, D_0 值为1.87Gy, $n=1.4$ 。但是,按成集落率及集落细胞密度判断,CFU-F并非是一群体,因此,可依致密集落和疏松集落的存活率来测定成克隆基质祖细胞的辐射敏感性。形成致集落的群体是高辐射敏感性的,其 D_0 值为0.65Gy, $n=6.7$;而形成疏松集落的群体则辐射抗性较高,其 D_0 值为4.26Gy, $n=1.0$ 。Cyapoba等用豚鼠骨髓进行体外液体单层培养出的CFU-F,同样存在高和低辐射敏感的两个亚群,其 D_0 和 n 值分别为1.43Gy, $n=1.0$;4.31Gy, $n=1.0$ 。在活体条件下,不同剂量单次全身照射大鼠其总集落的 D_0 值为1.74Gy, $n=2.1$,其中致密和疏松集落值分别为1.24Gy, $n=1.90$ 和2.09Gy, $n=2.5$ 。

在原位,即照射分离出的股骨中全部能形成集落的细胞 $D_0=3.0$, $n=1.5$,其氧增比(OER)为1.6,其中致密和疏松集落的 D_0 值、 n 值、OER分别为1.69Gy,4.1,2.6和3.88Gy,0.9,0.9。因此,只有在体外培养形成致密集落的基质祖细胞才表现出完全的氧效应。从大鼠实验所获成克隆基质祖细胞辐射敏感性较造血实质细胞低,但存在高、低辐射敏感性的两个亚群。另外,在活体照射条件下,用豚

鼠实验时,Ковригина等^[14]发现,可能出现造血基质祖细胞储备群体的过程。

Friedenstein等^[15]照射豚鼠骨髓条块或骨髓细胞悬液后培养CFU-F,两种条件有相似的剂量效应曲线, D₀值分别为 1.93±0.56Gy和 1.87±0.16Gy,还有相同的n值1.5。Werts等^[16]用250kV X射线在体内外照射小鼠造血基质祖细胞,其D₀值分别为2.15和2.3Gy。Xu等用11~13周的小鼠进行单次X射线或中子照射,基质祖细胞D₀值及n值分别为1.64±0.07Gy, n=0.2; 1.36±0.14Gy, n=1.0±0.2^[17]。Nikkls等^[18]用4周龄(体重14~16克)及12周龄(26~30克)小鼠测定辐射敏感性,二者D₀值分别为1.59和1.65Gy。Суворова等^[19]用非血液病患者的正常骨髓作体外单层培养CFU-F,致密型者D₀=4.31Gy, n=1;疏松型的D₀=4.31Gy, n=1。我们早年利用体外液体单层培养小鼠骨髓基质成纤维细胞集落(CFU-F)并测定昆明小鼠骨髓的辐射敏感性,其D₀值为2.10Gy, n=1.2^[20]。

总之,定量研究造血微环境成分的辐射敏感性,可测定该池大小、数量、特性及功能等,这对造血损伤与修复能力的预测,对放射治疗和辐射血液临床等均有重要的实际和理论意义。

1.2 转移造血微环境祖细胞(THMP)的辐射敏感性

转移造血微环境祖细胞,又称转移造血微环境单位(HMTU)。将骨髓细胞经γ射线照射后植入受体肾脏被膜下,经1.5~2.5个月取出植入物,观察并计数该骨髓腔内所含骨髓基质细胞集落数。结果表明: D₀=4.44Gy, n=5.2, HMTU具有较大的辐射抗性和对亚致死损伤的修复能力。而在中子照射后,则D₀=1.61Gy, n=1.4, 肩区也明显缩小。

1.3 小鼠胎肝造血基质细胞株(MFLSC)的辐射敏感性

陈家佩等^[21]建立的MFLSC株经γ射线照射后,两次实验所得的D₀值分别为3.34和4.16Gy。

2 影响辐射敏感性的因素

除不同种属动物、不同照射条件等因素外,低氧也可影响CFU-F的辐射敏感性。

2.1 低氧对大鼠骨髓基质成克隆细胞(CFU-F)的辐射防护作用。

Коесникова等^[22]对比研究了在空气中和在含8% O₂的低氧混合气体(GHM-8)中γ射线照射大鼠骨髓悬液后CFU-F的存活率及其辐射防护作用结果。GHM-8组CFU-F的存活率比空气中照射者增高70%。低氧的辐射防护效应主要表现在培养中形成致密集落的细胞亚群上。致密和疏松集落的剂量降低系数(DMF)分别为2.4和1.6。在上述的低氧条件下,正常组织细胞辐射敏感性降低,而长期在机体内处于低氧状态的肿瘤细胞则无反应。因此,用低氧混合气体可提高正常组织辐射耐受剂量,从而可选择性地增强对肿瘤的辐射效应。

2.2 低氧对大鼠骨髓成克隆基质祖细胞照射后修复能力的影响。

Конюляников等^[23]观察GHM-8对大鼠CFU-F在潜在性致死辐射损伤修复能力的影响时,以不同剂量单次全身照射大鼠后,立即或经24小时后接种培养骨髓单个核细胞。CFU-F存活率按其在骨髓有核细胞中的浓度和每股骨髓中的绝对含量计算。对照组在空气中一次全身照射后24小时的CFU-F剂量存活曲线呈双向组分:辐射敏感组分和辐射抗性组分。前一组分的D₀=3.29Gy, n=1.1;后一组分的D₀=10.86Gy, n=0.44。而在低氧中照射者,其敏感组分D₀=3.03Gy, n=1.0;抗辐射组分D₀=8.52Gy, n=0.52,抗辐射CFU-F的DMF为0.79,敏感的为0.92。由此可见,低氧条件下照射动物一天后培养与立即培养者不同,前者不提高CFU-F的存活率。依CFU-F在大鼠每股骨中绝对值为指标时也出现类似情况。

照后立即培养,出现单向CFU-F存活率的剂量存活曲线,而照后细胞在体内停留24小时后培养,则为双向的剂量存活曲线(除形成致

密集落的 CFU-F 亚群外),即出现辐射敏感和抗辐射两个组分。多数情况下低氧不具有防护效应,DMF 小于 1。这可能因低氧照后 CFU-F 潜在致死损伤修复能力较在空气中照射者差,但不能除外在照后至处死小鼠后取骨髓的一昼夜中发生由储存池动员 CFU-F 不同亚群的复杂过程。

低氧对 CFU-F 修复亚致死辐射损伤能力的影响:总剂量 2~15Gy,分 5 次每隔 6 小时照射一次,研究 CFU-F 修复亚致死损伤能力。此时剂量-效应曲线为 S 型,以 CFU-F 在骨髓细胞中相对含量为测定 CFU-F 存活率指标,则在空气中照射时的 $D_0=4.06\text{Gy}$, $n=1.7$,而在低氧中照射的 $D_0\approx 5.5$, $n=1.4$,DMF 为 1.4;以 CFU-F 在每股骨中的绝对值为指标,当在空气中照射的 CFU-F 的 $D_0=2.25$, $n=2.1$,而在 GHM-8 中照射者 $D_0=3.27$, $n=1.3$,DMF 为 1.5(单次照射的 DMF 为 1.7)。因此,用 CFU-F 存活率为指标,分次照射情况下,低氧的防护效应有所下降。在 2~12.5Gy 范围内,以分次照射后经 24 小时培养的 CFU-F 存活率为指标,则 CFU-F 存活率不仅不随照射剂量的增大而下降,在空气中和低氧条件照射时反而升高。按 CFU-F 绝对数来测定其存活率,结果表明 CFU-F 是异源性群体,其在空气中照射时的敏感群体 $D_0=3.62\text{Gy}$, $n=0.4$,而抗辐射群体的 $D_0=25.5\text{Gy}$, $n=0.1$;低氧条件下照射的敏感群体 $D_0=4.83\text{Gy}$, $n=0.36$,抗辐射 CFU-F 的 D_0 值为 12.06Gy , $n=0.14$ 。辐射敏感的 DMF 为 1.3,而抗辐射的为 0.5。由此可见,在 GHM-8 条件下照射大鼠造血 CFU-F 后,较低辐射抗性的 CFU-F 修复潜在性辐射损伤和亚致死辐射损伤能力都呈下降趋势,而占 CFU-F 总数 10% 的具有较强辐射抗性的亚群则降低更加明显。

3 造血基质祖细胞对造血调控机理的研究与展望

3.1 正常造血的调控

造血是由正负生长因子以液态或结合细

胞外基质在细胞膜上相互作用而调节的。原始造血干细胞是被细胞因子的分子或单一的整合蛋白粘附于骨髓腔中,但有时也接触广泛而多样的细胞因子。这些因子的浓度和与各种物质混合的情况决定着干细胞的命运:分化、增殖、存活或死亡。现已知有 12 种淋巴因子、3 种粒系 CSF(集落刺激因子)、红细胞生成素、多种间叶细胞因子(即造血基质细胞产生的后代细胞因子,亦即上述的非细胞性基质),它们都分布在造血和造淋巴细胞系统中,其大部分作用在早期干细胞及其后代。现已发现,尚有各种抑制因子,最常见的是 MIP-1a 和 TGF- β 。这些调节现象都发生在密集的骨髓腔中。其中,造血的干/祖细胞都是以各种调节细胞膜相接的。有些细胞因子尚根据分化情况的某种应激性支持因子作用于早期干细胞。用高纯度造血祖细胞或干细胞和无血清系统可检出 10~12 种细胞因子。这些因子在协同作用下充分表达干细胞分化和增殖潜能。各种蛋白酶(Protease)可在调节因子和/或作用于这些成分中起重要作用,也可调节其他有关系统成分的增殖^[24]。总之,造血的调节是原始造血干细胞处于非常密的基质及其产物的持续变化与其多种抑制和刺激性分子相互接触的环境中,既有平衡、稳定,又有应激调控的多环节、多因素作用的综合动态过程。学者们已意识到造血调节的复杂性和对机体的重要性,正从多层次上深入探索。

3.2 造血基质细胞对骨髓细胞的调控

小鼠骨髓在体外培养中,发现基质成纤维细胞脂及细胞和细胞表面的硫酸类肝素起重要作用。进一步从 10T1/2 细胞株或 Clone 细胞与造血细胞共培养研究发现,造血祖细胞的增殖与分化能在造血微环境中与其各自特异性基质细胞(即粒系、巨噬系与成纤维细胞;多能祖细胞与脂肪细胞)在共培养中粘附后并有硫酸类肝素的参与下实现^[25]。Wang 等发现骨髓来源的 ST3⁺/ST4⁻ 两基质细胞株可促进 Cytokines 向培养体系中释放 CSA(刺激)和 INH(抑制)两种因子。他们发现 ST3 株还有两

个亚群:2A 和 9D. 因此,作者认为 INH 的出现表明成纤维细胞亚群是有差别的群体,它是由天然调节剂皮质醇修饰的^[26]。

有人在研究各种造血细胞与其共有骨髓基质细胞(MSC)间的关系发现,VLA-4 的亚群 β 及 α(分别为 CD₂₉,CD_{49d})的单抗,可抑制白血病和淋巴瘤细胞(LL)粘附于未激活的 MSC,血管细胞粘附分子-1(VCAM-1)对 BMSC 的结构低水平表达能通过 IL-4 及 IFNα 上调;这些细胞因子上调 VCAM-1 可伴有使 LL 细胞向 MSC 粘附增多;VCAM-1 和 VLA-4α 的 MAB 可部分阻断 IL-4 和 TNFα 诱导的异型 LL 细胞粘附 MSC 的增加。这都表明,基质产生的分子在正常和癌细胞的调节中起规律性作用,从而可能对癌症的治疗提供条件^[12]。Minguell 等^[25]研究表明,造血细胞、基质细胞和 ECM(细胞外分子)可由一个糖蛋白生长因子(GF)网络成一个具有两种功能的复合体,一是刺激造血细胞增殖,二是抑制导向死亡的过程,即所谓 Apoptosis(凋谢)。作者在体外基质细胞层上加入 IL-3 后,可促进因缺乏 FDCP-1 造血细胞退变的修复。这是由于遭到退变的细胞在新的适宜环境条件下,IL-3 的恢复、FDCP-1 细胞的存在维持了恒定的调控和修复,这就是细伤损伤的逆转。

3.3 骨髓基质细胞可促进逆病毒介导的基因转移至造血干细胞

大量工作证明,白血病、淋巴瘤以及许多肿瘤在实验性基因治疗时,都首先在体外将逆病毒介导的基因转移至造血基质细胞层中,其具备完善的条件以高效转移基因,而不需外源性 GF. 其后,再将基质层中受转染的造血细胞输注给受者体内。数月后,便可在受者骨髓、脾和外周血单个核细胞中检出转入的基因。如此,在骨髓基质层中便可产生单克隆性造血干细胞。这表明,该环境中具有将载体稳定整合入细胞基因组中的条件,从而可提供干细胞基因治疗手段^[27]。目前,又有报告,已将逆病毒载体改为微玻璃球的更为简便而表达效率更高的新方法。

3.4 展望

造血基质祖细胞是一个尚未完全分化的非均一群体,广泛地分布于造血、免疫及相关组织器官中,起着对各器官的支持、调节、营养和协调各相关器官功能的作用。由于新技术特别是分子生物学的长足进展,已把人们不久前揭示的“造血基质是整个造血免疫器官的重要组成部分并起着调控各器官功能的深刻作用”^[28]又远远推到后面。上述内容只是基质细胞的性质、功能的一个侧面,今后尚有更多的问题如在基因治疗上的作用和调节等不断被揭示。但从目前的现状可以预示,造血基质对基本器官及其他相关器官功能的调控和影响必将有更多新的发现。同时,这种细胞的新类型和新分子的不断涌出,也必将启发人们不断开拓新思维,促进医学的发展和进入一个新时代。

参 考 文 献

- 1 Конопляницков АГ. Радцобиология Тволовъих Клеток. Москва: Энергоатомиздат 1984:119
- 2 于洪臣 刘 及. 白求恩医科大学学报, 1988;14: 105
- 3 Фриденштейн АЯ Лурца ЕА. Клеточные Основы Кровотворного Микроокружения Москва: Медицина, 1980:214
- 4 于洪臣等. 辐射研究与辐射工艺学报, 1994; 12:40
- 5 刘 及. 辐射血液学. 北京:原子能出版社, 1991:111
- 6 Knospe W et al. Exp Hematol, 1993; 21:257
- 7 Ikehara S. Autoimmune Diseases, 1991;8:237
- 8 Ogura M et al. Proc Natl Acad Sci, 1989; 86: 4225
- 9 Abraham NG et al. Exp Hematol, 1993; 21:263
- 10 Hardy CL et al. Exp Hematol, 1993; 21:283
- 11 刘 及等. 吉林医科大学通讯, 1973;2:47
- 12 Juneja HS et al. Exp Hematol, 1993; 21:444
- 13 Колесникова и др. Радцобиология 1992;32:844
- 14 Ковригина АМ и др Патол Физиол Эксп Терап, 1989; (6):18
- 15 Friedenstien AJ et al. Int J Radiat Biol, 1981;39: 537

- 16 Werts ED et al. Radiat Res, 1980; 81:20
 17 Xu CX et al. Radiat Res, 1983;96:82
 18 Nikkls PGJ. Radiat Res, 1987;109: 330
 19 Суворова ЛА и др. Пробл Тематол Крови, 1981;26: 30
 20 于洪臣 刘 及. 白求恩医科大学学报, 1982;8 (Suppl):207
 21 陈家佩等. 中国实验血液学杂志,1993; 1:25
 22 Колесникова А и др. Радиобиология, 1992;32:720
 23 Конопников АГ и др. Радиоцион Бол Дизкол, 1993;33:244
 24 Quesenberry PJ. Exp Hematol, 1993;21:711
 25 Minguell JJ et al. Exp Hematol, 1993; 21:55
 26 Wang H et al. Exp Hematol,1993;21: 675
 27 Cassel A et al. Exp Hematol, 1993; 21:585

淋巴细胞及细胞因子对造血系统辐射敏感性的调节作用

第四军医大学防原医学教研室 王波涛综述 王克为 张绍章 张卿西审校^①

摘 要:在文献基础上分析了作为免疫调节系统组分的细胞及细胞因子对骨髓造血干细胞的影响,淋巴细胞对早期造血干细胞有刺激和抑制作用,并影响其辐射敏感性。同时,详细描述了照射条件下,几种重要的细胞因子对造血干细胞的影响,分析其辐射防护作用机理。论证了辐射对造血系统的损伤与损伤免疫调节机能有关。

哺乳动物机体接受电离辐射作用最严重的后果是造血系统损伤,继而发生出血、贫血、感染等一系列综合症候群。该研究有助于认识放射病的发病机制,从而进一步寻找有效的预防、治疗放射病的方法。

多能造血干细胞是造血系统最原始成分,它决定着辐射作用后机体造血恢复情况。利用 Till 和 McCulloch 创建的脾结节实验方法,研究脾集落形成单位(CFU-S)可获得这类细胞的所有放射生物学特性。形成脾集落的脾集落形成细胞(CFC-S)组成不均一,它由具有不同增殖潜力的造血干细胞组成。一部分脾集落形成细胞(CFC-S)移植后 7~8 天形成集落(CFU-S-8),这种细胞分化程度高,增殖潜力低;另一部分则分化程度低,有很高的增殖潜力,移植后生长 11~12 天在脾脏形成集落(CFU-S-12),CFU-S-12 能生成子代 CFC-S 以保障红系、髓系及淋巴系的再生恢复^[1]。

CFC-S 辐射敏感性极高: D_0 值为 1Gy,外推数 n 为 1.5~1.0。对于 CFC-S-8 及 CFC-S-12,

其值差别不大,但与 CFC-S-8 相比,CFC-S-12 亚致死剂量辐射损伤后恢复能力显著降低^[2]。

造血微环境在保障和维持多能干细胞生存、增殖,分化中发挥重要作用。这时造血干细胞增殖与分化是通过该细胞与构成造血器官基质的所有细胞和细胞外因子的相互作用来实现^[3],因而调节是短暂的。作为造血干细胞调节细胞的 T 淋巴细胞是微环境重要组分。现已证实,造血机能的调控不仅依靠细胞间相互作用,而且还依赖于分泌的淋巴因子作用。

1 T 淋巴细胞对集落形成的调节作用

1.1 辅助性 T 淋巴细胞对 CFU-S 的调节作用

T 淋巴细胞参与造血过程的本质与机理方面的研究,在 60 年代末期开始引起人们的极大关注。Lipori (1975 年)指出,先天胸腺缺陷及切除胸腺的小鼠受照后恢复能力有缺陷。在免疫系统对异源干细胞增殖与分化影响方面做了大量工作。已经证实,相对于其它系统而言,造

^① 北京放射医学研究所