

- [9] Bingisser RM, Tibrook PA, Holt PG, et al. Macrophage-derived nitric oxide regulates T cell activation via reversible disruption of the Jak3/STAT5 signaling pathway[J]. *J Immunol*, 1998, 160: 5729.
- [10] Wink DA, Vodovotz Y, Laval J, et al. The multifaceted roles of nitric oxide in cancer[J]. *Carcinogenesis*, 1998, 19: 711-721.
- [11] Kim YM, Son K, Hong SJ, et al. Inhibition of protein synthesis by nitric oxide correlates with cytostatic activity: nitric oxide induces phosphorylation of initiation factor eIF-2 alpha[J]. *Mol Med*, 1998, 4: 179.
- [12] Ziche M, Morbidelli L, Chodhuri R, et al. Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis [J]. *J Clin Invest*, 1997, 99: 2625-2634.
- [13] Mitchell JB, DeGraff W, Kim S, et al. Redox generation of nitric oxide to radiosensitize hypoxic cells [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1998, 42: 795-798.
- [14] McKinney LC, Aquilla EM, Coffin D, et al. Ionizing radiation potentiates the IFN-gamma and/or LPS in murine macrophage cell lines: role of TNF-alpha [J]. *J Leukoc Biol*, 1998, 64: 459-466.
- [15] Vodovotz Y, Coffin D, DeLuca AM, et al. Induction of nitric oxide production in infiltration leukocytes following in vivo irradiation of tumor-bearing mice [J]. *Radiat Oncol Investig*, 1999, 7: 86-97.
- [16] Clarencon D, Lestaevell P, Laval JD, et al. Valtametric measurement of blood nitric oxide in irradiated rats [J]. *Int J Radiat Biol*, 1999, 75: 201-208.

Nitric oxide and ionizing radiation

GONG Shou-liang

(*MH Radiobiology Research Unite, Norman Bethune University of Medical Sciences, Changchun 130021, China*)

Abstract The discovery of nitric oxide (NO) established a complete new concept on the cell signal transduction, i. e. the gas signal produced from one cell can pass through the cell membrane to regulate the functions of another cell. NO has unique physical and chemical natures. NO in vivo is synthesized by L-arginine and oxygen under the action of NO synthase (NOS). NOS mainly includes 3 kinds of subsets: endothelial NOS (eNOS), neuronal NOS (nNOS) and inducible NOS (iNOS). These NOSs are regulated by Ca^{2+} /calmodulin, phosphorylation and NO. The biological functions of NO are very wide and bidirect. NO might facilitate the radiosensitivity of cells in vitro, but display a radioprotective effect in vivo.

Key words nitric oxide; nitric oxide synthase; ionizing radiation

文章编号: 1001-098X(2000)04-0173-05

促血小板生成素与辐射损伤

张军权, 张浩

(北京放射医学研究所, 北京 100850)

摘要: TPO(促血小板生成素)是巨核系造血的主要刺激因子,近年的研究表明, TPO与造血干细胞之间存在密切联系。TPO可促进辐射损伤后的造血重建,有可能解决急性放射病中血小板恢复滞后的问题。TPO在造血干细胞移植、血小板采集与分离等领域也有广阔的应用前景。

关键词: 促血小板生成素; 辐射损伤; 造血干细胞

中图分类号: R818.4 文献标识码: A

1 TPO简介^[1]

20世纪50年代后期,有些学者提出,在生理条件下,血小板的生成受到一种体液因子的控制,并将这种因子命名为 thrombopoietin(TPO,促血小板生成素)。虽然在血小板减少症动物和病人的血清、血浆、尿液以及肾细胞的条件培养基中均可检测到

收稿日期: 2000-05-15

作者简介: ①张军权(1967-),男,天津蓟县人,北京放射医学研究所博士研究生,主要研究放射病的治疗。

②张浩(1968-),男,天津市人,北京放射医学研究所助理研究员,博士,主要研究方向:基因治疗。

审校者:北京放射医学研究所 毛秉智

TPO活性,但这种因子的分离纯化相当困难。由于得不到纯化的TPO,又考虑到多种细胞因子对巨核系造血有刺激作用,人们曾对巨核系造血特异性刺激因子的存在产生怀疑。直到1990年发现造血生长因子受体超家族的成员之一c-Mpl,当时观察到c-Mpl的表达仅限于造血祖细胞、巨核细胞和血小板,c-Mpl的反义寡核苷酸特异性抑制体外巨核系造血,人们推测c-Mpl的配体可能就是长期寻找的TPO。根据这一推测,1994年几个研究小组分别报道了TPO基因的克隆成功。TPO也被称为巨核细胞生长分化因子(MGDF)。

人的TPO分子含332个氨基酸残基,由两个结构域组成,N端153个氨基酸具有TPO的全部活性,与EPO(促红细胞生成素)高度同源,被称为EPO样结构域,但EPO的N糖基化位点在TPO中并不存在;C端结构域含6个N糖基化位点和18个O糖基化位点,C端结构域的高度糖基化可能对TPO起稳定作用,延长TPO的半寿期。N端结构域和C端结构域由双碱性氨基酸组成的潜在性蛋白降解位点连接,且在各种属中高度保守,在体内这一位点可能与C端释放有关。

2 TPO与造血干细胞^[2]

TPO与c-Mpl基因同时敲除的小鼠,其造血功能缺陷仅限于巨核细胞和血小板,而外周血红细胞压积、淋巴细胞数、单核细胞数、嗜酸性粒细胞数和中性粒细胞数均正常,骨髓和脾脏中形态上可辨别的造血细胞数量未见明显异常。但是,单纯敲除TPO基因或单纯敲除c-Mpl基因的小鼠,其造血缺陷并不限于巨核细胞系,其它系祖细胞亦减少一半以上,由于多数定向祖细胞并不表达c-Mpl,它们的增殖与存活并不依赖于TPO的作用。通过对c-Mpl基因敲除小鼠造血干细胞的研究,这一问题才渐趋明了:体外培养发现,这种小鼠中较成熟的多能干细胞的数目较正常低10倍,在受照射受体脾脏可形成集落的细胞数也有同样程度的降低,确定性长期竞争性重建分析(definitive long-term competitive repopulation assays)也发现了严重的造血干细胞缺陷,这种干细胞即使10倍数量仍不能与野生型细胞竞争而重建造血。其它独立的研究证实,纯化的造血干细胞群中,表达c-Mpl的组份就包括了几乎全部造血重建活性。

TPO与造血干细胞之间关系的研究,至少在以

下几方面有实际意义:(1)TPO可能比当初设想产生更强的造血恢复作用,这种预测已经在一些临床前研究中得到部分证实;(2)TPO可用于造血干细胞的体外扩增,用于造血干细胞移植和基因治疗;(3)由于TPO可刺激造血干细胞的扩增,在治疗造血系统增殖性疾病时,应警惕这种副作用。

3 TPO与巨核系造血^[3]

通过基因敲除小鼠的研究已经证明,TPO是巨核系造血的主要生理调节物。同时敲除c-Mpl和TPO基因的小鼠,外周血血小板数仅为正常小鼠的5%~10%,骨髓和脾脏切片发现巨核细胞数也有同样程度的降低,并且发现巨核细胞DNA成倍性低于正常,集落培养发现巨核系祖细胞比正常小鼠低6倍,小的巨核系集落的缺失,提示较成熟阶段的定向祖细胞对TPO或其受体的缺失更为敏感。这些资料表明,TPO可作用于巨核系造血的多个阶段,通过控制祖细胞的增殖与分化,保持巨核细胞数目稳定。单独缺失TPO的小鼠与单独缺失c-Mpl的小鼠,表现出近乎一致的表型,提示TPO为c-Mpl的独有配体。

TPO虽然在保持血小板数目方面起重要作用,但它似乎并不直接作用于血小板产生与释放这一巨核系造血的终末阶段。单纯敲除TPO基因或单纯敲除c-Mpl基因的小鼠,其血小板减少的程度并不比巨核细胞减少的程度高。体内实验中,注射TPO后,血小板数的增加较巨核细胞数的增加延迟几天。体外培养实验中,TPO并不刺激血小板释放,高浓度时反而抑制这一过程。基因敲除小鼠的血小板数虽然降低,但血小板超微结构未发现明显形态异常,血小板激活与粘附功能正常,出血时间仅略延长。

虽然基因敲除小鼠的血小板数明显降低,但可正常存活,无自发出血倾向。这些现象提示,虽然TPO是巨核系造血的主要刺激物,但其它不依赖于TPO的机制仍然存在,以控制残存的血小板生成。许多细胞因子在体外实验中可刺激巨核细胞增殖与分化,体内实验中可刺激血小板产生。基因敲除小鼠注射白细胞介素-6,白血病抑制因子,白细胞介素-11或干细胞因子可使外周血血小板数达到正常小鼠水平,但是基因敲除小鼠血清和器官的条件培养基中均未能检测到这些细胞因子的代偿性产生。体外实验发现,白细胞介素-3是较强的巨核细胞产生刺激物,但白细胞介素-3和c-Mpl基因同时敲除的

小鼠与单纯敲除 *c-Mpl* 基因的小鼠相比,血小板数、巨核细胞数和定向祖细胞数均未见明显差别,因此其它细胞因子对残存巨核细胞和血小板产生的调控作用尚需进一步研究

4 辐射对 TPO 表达的影响

近年的研究表明,辐射后某些细胞因子与受体可发生数量与功能的变化,研究这些细胞因子与受体的变化规律,有助于深入了解辐射损伤后造血调控的机制,综合判断机体的造血恢复潜力,对急性放射病治疗方案的选择具有指导意义。关于辐射对 TPO 基因表达的影响,目前仅见个别报道, Mouthon 等^[4]用 20Gy 对小鼠肝区的 70% 进行局部照射,结果,骨髓造血祖细胞和巨核细胞数增加,外周血血小板和中性粒细胞数增加,照后 14d 达高峰,血清 TPO 浓度于照后 5h 即见升高,至照后 14d 仍高于正常水平;通过 Northern 点杂交法和核糖核酸酶保护试验分析发现,照后肝脏 TPO mRNA 水平升高,对 TPO 基因敲除小鼠进行同样照射,仍可检测到同样程度的血小板水平升高。作者认为,肝脏局部照射通过不依赖于 TPO 的机制刺激了造血。 Cohen-Solal 等^[5]对小鼠进行 9.5Gy 全身照射,照后第 2 天血小板开始下降,第 8 天达最低值,照后血清 TPO 活性明显升高,而肝、肾细胞 TPO mRNA 水平与对照组无明显差别。作者认为,照后 TPO 呈组成型表达, TPO 的清除依赖于 *c-Mpl* 介导的内在化途径,照后表达 *c-Mpl* 的细胞大量死亡,导致血清 TPO 水平的升高。

5 TPO 治疗急性放射病之现状

TPO 可以促进血液病和肿瘤放化疗后巨核细胞和血小板的恢复。急性放射病实验治疗研究证实, TPO 可促进巨核细胞、血小板系统的恢复,提高外周血血小板的数量,在出血的防治方面起到关键的作用,看来, TPO 的应用可解决血小板恢复滞后带来的临床问题。Kaushansky 等^[6]给小鼠腹腔注射卡铂(carboplatin) 1.2mg 同时进行 3.5~5Gy 全身照射,照后不同时间给予 TPO 治疗,与对照组相比,外周血血小板数和红细胞数提前 10~14d 恢复,白细胞提前 1~2d 恢复。Hokom 等^[7]给小鼠腹腔注射卡铂 1.25mg 后 4h 进行 5Gy 全身照射,照后 15~16d,血小板数减少了 98%,在 23d 的观察期限内,血小板数未能恢复至正常水平,而给予 PEG-

rMGDF(聚乙二醇化的重组巨核细胞生长分化因子)组的血小板最低值于照后 9~10d 出现,血小板数为对照组的 3 倍,至照后 19~21d 恢复正常。经电镜观察, PEG-rMGDF 治疗后产生的血小板的形态、大小和颗粒分布等方面未见异常;照后 13d,白细胞数达最低值,仅为正常小鼠的 6%, PEG-rMGDF 未对白细胞数产生影响;照后 23d,红细胞数降为正常值的 20%, PEG-rMGDF 治疗组的红细胞数最低值为正常值的 60%,且在照后 23d 恢复正常。对照组照后 23d 生存率为 6%,治疗组为 86%。Faresse 等^[8]比较了 rMGDF、PEG-rMGDF 和 PEG-rMGDF+rhG-CSF(重组人粒细胞集落刺激因子)联合应用对 7Gy 全身照射恒河猴的治疗作用:以照后血小板数低于每微升 20000 定为血小板减少,对照组血小板最低值为每微升 4000,三种治疗方案分别使照后血小板减少时间从 12.2d 缩短至 0.25d、0d 和 0.5d,血小板的最低值分别增至每微升 28000、43000 和 30000,三种治疗方案均可促进中性粒细胞恢复,与单用 rhG-CSF 组比较, PEG-rMGDF+rhG-CSF 联合治疗组照后中性粒细胞减少时间有所改善。

Fibbe 等^[9]在进行小鼠同基因骨髓移植实验时,给供体小鼠腹腔内注射 TPO,每天 20kU,共 5d,结果血小板数增加 2.5 倍,集落培养发现,骨髓和脾脏的造血祖细胞数明显增加;受体小鼠接受 8.5Gy 全身照射,然后移植 10^5 个骨髓细胞,移植后部分小鼠给予 TPO 治疗 5~14d,剂量每天 20~30kU,腹腔内注射或皮下注射,与对照组相比, TPO 未见促进血小板恢复的作用;但是,若移植同样数量的经 TPO 处理后的供体小鼠的骨髓细胞,血小板恢复明显加快,血小板最低值改善,红细胞恢复也明显加快,在移植后 12d 出现血小板最低值时,骨髓爆炸型红系集落生成单位明显增多,外周血网织红细胞计数也明显增多,因此红细胞的恢复可能为 TPO 对红系造血的直接作用所致。作者认为,对于致死剂量照射的动物,在造血干细胞移植之前供体应用 TPO,是一种促进血小板和红细胞恢复的有效手段。Neelis 等^[10]对恒河猴进行 5Gy 全身照射,诱发了为期三周的全血细胞减少期,每天皮下注射 TPO,连续 21d,结果促进血小板和网织红细胞的恢复,血小板最低值变得不明显,较快恢复正常,与对照组相比,治疗组不再需要血小板输注,血红蛋白值迅速变得稳定,单用 TPO 治疗对中性粒细胞影响不明显;单用 G-CSF 治疗,连续 21d,可促进中性粒

细胞恢复,但对血小板的影响不明显;TPO与G-CSF联合应用,对血小板减少症的治疗效果与单用TPO时相似,但与单用G-CSF相比,中性粒细胞的恢复明显增强;此外,在照后第2周,TPO治疗组的骨髓CD34细胞数增加两个数量级,而G-CSF未见这种作用,照后第3周,反映红系造血的乳酸脱氢酶同工酶I值明显增加,TPO和G-CSF治疗均未见副作用。同一课题组^[11]对恒河猴进行8Gy大剂量全身照射,移植 1×10^4 /kg~ 3×10^4 /kg高度纯化的同基因造血干细胞,移植后全血细胞减少的时限从5~6周缩短至3周,照后1~21d,每天皮下注射TPO,或协同注射G-CSF,均未能促进移植后血小板数量的恢复,G-CSF治疗对中性粒细胞的恢复作用也不明显;为了排除移植的干细胞数量少和亚群选择不当的可能性,三只动物移植了 10^7 /kg的未纯化的同基因骨髓细胞,TPO仍未见治疗效果,此结果提示,大剂量照射后进行造血干细胞移植,TPO不能阻止血小板减少症的发生。作者认为,TPO的治疗效果依赖于照后1周内TPO靶细胞的存在。

Shibuya等^[12]观察了单次给药对受辐射小鼠造血恢复的影响:小鼠经3.5Gy亚致死剂量照射后1h,单次注射PEG-rM GDF1~ 640^4 g/kg,可促进外周血红细胞、白细胞和血小板的恢复,且疗效呈剂量依赖性增强;对照组骨髓巨核系、红系和髓系祖细胞以及第12天脾集落形成单位明显降低, 80^4 g/kg治疗后,这4种祖细胞恢复加快;照后2d,取治疗组小鼠骨髓细胞,移植给同基因的8.5Gy致死剂量照射的小鼠,受体小鼠的90d生存率可达70%,而移植对照组小鼠骨髓细胞和未接受骨髓移植的受照小鼠在照后14~17d死亡;随着照射与给药时间间隔的延长,治疗效果渐减弱;与此相反,照后1h单次注射G-CSF,主要升高白细胞,且在G-CSF注射剂量达 1000^4 g/kg时,其效果才达到PEG-rM GDF注射量 80^4 g/kg的水平。Neelis等^[13]对6Gy照射小鼠照后0~4h内腹腔注射TPO 12^4 g/kg,结果可明显阻止严重血小板减少症的发生,同时促进白细胞和红细胞的恢复,在照后0~4h范围内,随着给药与照射时间间隔的延长,疗效逐渐降低,对造血的刺激作用由多系渐转向巨核系为主;静脉注射TPO的研究表明,在 4^4 g/kg与 1.2^4 g/kg之间,TPO疗效递减;在 3×3 Gy分次照射小鼠的实验中,每次照射相隔24h,每次照射后2h腹腔内注射TPO 12^4 g/kg,彻底阻止了严重血小板减少症和贫血的发生。可见,早

期足量给药对TPO发挥疗效至关重要。

6 展望

TPO在以下领域有广阔的应用前景:(1)放疗及化疗所致的血小板减少及造血损伤;(2)造血干、祖细胞的体外扩增及巨核细胞和血小板的定向诱导生成;(3)外周血干细胞动员,血小板采集与分离,血小板保存等。

参考文献:

- [1] Eaton DL, de Sauvage FJ. Thrombopoietin: the primary regulator of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis[J]. *Exp Hematol*, 1997, 25(1): 1-7.
- [2] Kaushansky K. Thrombopoietin and the hematopoietic stem cell[J]. *Blood*, 1998, 92(1): 1-3.
- [3] Alexander WS. Thrombopoietin and the c-Mpl receptor: insights from gene targeting[J]. *Int J Biochem, Cell Biol*, 1999, (10): 1027-1035.
- [4] Mouthon MA, Vandamme M, Gourmelon P, et al. Preferential liver irradiation enhances hematopoiesis through a thrombopoietin-independent mechanism[J]. *Radiat Res*, 1999, 152(4): 390-397.
- [5] Cohen-Solal K, Villeval JL, Titeux M, et al. Constitutive expression of mpl ligand transcripts during thrombocytopenia or thrombocytosis[J]. *Blood*, 1996, 88(7): 2578-2584.
- [6] Kaushansky K, Lin N, Chossmann A, et al. Thrombopoietin expands erythroid, granulocyte macrophage, and megakaryocytic progenitor cells in normal and myelosuppressed mice[J]. *Exp Hematol*, 1996, 24(2): 265-269.
- [7] Hokom MM, Lacey D, Kinstler OB, et al. Pegylated megakaryocyte growth and development factor abrogates the lethal thrombocytopenia associated with carboplatin and irradiation in mice[J]. *Blood*, 1995, 86(12): 4486-4492.
- [8] Farese AM, Hunt P, Grab LB, et al. Combined administration of recombinant human megakaryocyte growth and development factor and granulocyte colony-stimulating factor enhances multilineage hematopoietic reconstitution in nonhuman primates after radiation induced marrow aplasia[J]. *J Clin Invest*, 1996, 97(9): 2145-2151.
- [9] Fibbe WE, Heemskerk DP, Laterveer L, et al. Accelerated reconstitution of platelets and erythrocytes after syngeneic transplantation of bone marrow cells derived from thrombopoietin pretreated donor mice[J]. *Blood*, 1995, 86(9): 3308-3313.
- [10] Neelis KJ, Dubbelman YD, Qingliang L, et al. Simultaneous administration of TPO and G-CSF after cytoreductive treatment of rhesus monkeys prevents thrombocytopenia, accelerates platelet and red cell reconstitution, alleviates neutropenia, and promotes the

recovery of immature bone marrow cells [J]. *Exp Hematol*, 1997, 25(10): 1084-1093.

- [11] Neelis K J, Dubbelman Y D, Wognum A W, et al. Lack of efficacy of thrombopoietin and granulocyte colony-stimulating factor after high dose total-body irradiation and autologous stem cell or bone marrow transplantation in rhesus monkeys [J]. *Exp Hematol*, 1997, 25(10): 1094-1103.
- [12] Shibuya K, Akahori H, Takahashi K, et al. Multilineage hematopoietic recovery by a single injection of pe-

glylated recombinant megakaryocyte growth and development factor in myelosuppressed mice [J]. *Blood*, 1998, 91(1): 37-45.

- [13] Neelis K J, Visser T P, Dimjati W, et al. A single dose of thrombopoietin shortly after myelosuppressive total body irradiation prevents pancytopenia in mice by promoting short-term multilineage spleen-repopulating cells at the transient expense of bone marrow-repopulating cells [J]. *Blood*, 1998, 92(5): 1586-1597.

Thrombopoietin and radiation injury

ZHANG Jun-quan, ZHANG Hao

(Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 1000850, China)

Abstract Thrombopoietin (TPO) is the primary regulator of megakaryocytopoiesis. Recent studies show that there is close relationship between TPO and hematopoietic stem cell. TPO can stimulate hematopoietic recovery after radiation injury. TPO may have widespread use in such areas as hematopoietic stem cell transplantation, platelets collection and separation.

Key words thrombopoietin; radiation injury; hematopoietic stem cell

文章编号: 1001-098X(2000)04-0177-04

生物因子治疗骨髓抑制的研究进展

李颖

(苏州医学院, 苏州 215007)

摘要: 人们已发现的生物因子种类繁多,不同类型的生物因子可通过作用于不同分化时期和不同类型的靶细胞,对骨髓造血细胞起辐射防护和促进骨髓造血恢复作用。本文重点介绍正性造血因子和负性造血因子在骨髓抑制中的作用以及多种造血因子的综合运用对骨髓造血功能的影响。

关键词: 生物因子; 骨髓抑制; 电离辐射

中图分类号: R392.11 **文献标识码:** A

急性辐射损伤以及肿瘤患者在放疗或化疗后,均可发生严重程度不等的骨髓功能抑制,尤其是急性辐射损伤患者,其外周血白细胞和血小板明显下降,引发致死性感染和出血;肿瘤患者也会因骨髓造血功能抑制而限制放疗或化疗的进行,甚至也会产生严重感染。目前,对骨髓功能抑制的治疗常使用的方法有外周造血干细胞移植(PBM T)、骨髓移植(BMT)和造血生长因子的运用。但是,PBM T和BMT不仅费用昂贵,操作复杂,而且并非适用于每个患者,而异基因骨髓移植所致的移植排斥又是难

以逾越的障碍,因而异基因骨髓移植受到许多限制。随着高新生物技术——基因工程的发展,人们可以获得越来越多的高纯度的重组生物因子,这些重组生物因子在急性辐射损伤的实验研究和临床救治中产生了极其重要的作用,并取得了开创性的成果,并有取代PBM T和BMT的趋向。

1 造血生物因子的分类

目前,人们根据作用于骨髓造血的不同时期把生物因子分为:(1)早期造血因子,如干细胞造血因子(SCF)、酪氨酸激酶受体-3的配体(Flt₃L);(2)系列定向造血因子,如IL-11(白细胞介素-11)、IL-3、IL-6、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、粒巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)等;(3)晚期造血因子,如红细胞生成素(EPO)、血小板生成素(TPO)等。也可

收稿日期: 2000-04-13

作者简介: 李颖(1972-),女,湖南益阳人,苏州医学院助教,硕士研究生,主要从事肿瘤免疫的研究。

审校者: 苏州医学院生物技术研究所 张学光
苏州医学院生物技术研究所 强亦忠