

文章编号: 1001-098X(2003)05-0232-04

FL 与辐射造血损伤

于丽梅^①, 陈肖华^②

摘要: FL (flt3 ligand) 是一种作用于早期造血细胞的生长因子, 通过与其受体 flt3 特异性结合, 促进造血干、祖细胞增殖分化。最近的研究表明, 在骨髓造血功能障碍时, FL 蛋白水平发生明显变化。机体辐射损伤后, 血浆中 FL 水平升高; FL 水平有可能作为辐射导致骨髓损伤的生物学指标。另外, FL 单独、或与其他细胞因子联合应用具有辐射损伤防治作用。

关键词: FL; 造血; 辐射

中图分类号: Q506, R818.03 **文献标识码:** A

FL and radiation hematopoietic injury

YU Li-mei^①, CHEN Xiao-hua^②

(^①Medical College of Beihua University, Jilin 132000; ^②Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Science, Beijing 100850, China)

Abstract: FL (flt3 ligand) is an early acting hematopoietic cytokine. By binding and activating its specific tyrosine kinase receptor flt3, FL can stimulate the proliferation and differentiation of hematopoietic stem and progenitor cells. Recently, it has been shown that the level of FL in plasma of patients with bone marrow aplasia increases dramatically. Plasma level of FL also can be elevated and is a possible bio-indicator for bone marrow aplasia in radiation-induced damage. Furthermore, FL, alone or in combination with other cytokines, provides protection from bone marrow aplasia after radiation.

Key words: flt3 ligand; hematopoiesis; radiation

FL (flt3 ligand) 是 fms 样酪氨酸激酶 3 (flt3) 的配基, 是一种与造血调控有关的造血生长因子, 可以维持造血干、祖细胞的生存, 与其他细胞因子协同促进造血干、祖细胞增殖分化。FL 通过与其受体 flt3 特异性结合, 启动细胞内信号转导, 主要影响早期的造血。近年来有关 FL 的研究较多, 本文就 FL 的表达水平与骨髓造血障碍的关系及 FL 防治辐射造血损伤的研究作一综述。

1 FL 与 flt3

1.1 FL

编码 FL 的基因在 20 世纪 90 年代初期被克隆出来, 小鼠和人的 FL 基因分别定位在第 7 号染色体和第 19 号染色体。基因编码区含有 8 个外显子, 外显子大小和序列在物种之间是相当保守的, 小鼠和人的 FL 在基因水平有 76% 的同源性^[1,2]。天然 FL 蛋白已经从小鼠胸腺基质细胞系纯化出来, 是一个分子质量为 65 000 的同源二聚体糖蛋白, 由两个分子质量为 30 000 的亚单位组成, 每个亚单位都含有分子质量为 12 000 的 N-和 O-糖链^[3]。

FL 以多种同源异型蛋白形式存在, FL mRNA 选择性剪接形成转录本翻译出不同形式的 FL 蛋白, 这些蛋白都具有相同的细胞因子螺旋区而 C-末端不同。现在的研究主要集中于膜结合型和可溶型 FL 蛋白。人类 FL 的主要形式是一种跨膜蛋白, 此跨膜蛋白可以被一种蛋白水解酶水解形成可溶性 FL。另一种膜结合型 FL 是一个含 220 个氨基酸残

收稿日期: 2003-05-20

作者简介: ^①于丽梅(1978-), 女, 北华大学(吉林, 132000)硕士研究生, 主要从事实验血液学研究。

^②陈肖华(1958-), 男, 军事医学科学院放射医学研究所放射病实验治疗研究室(北京, 100850)副研究员, 主要从事放射病实验治疗研究。

审校者: 军事医学科学院放射医学研究所 毛秉智

基的蛋白,它不是跨膜蛋白,只是借C-末端的疏水结构而锚定于细胞膜上,这是小鼠FL蛋白的主要形式,此蛋白没有蛋白水解酶的水解位点,不能形成可溶性FL。对第6个外显子的选择性剪接后表达出另一种FL蛋白,这个外显子在接近编码胞外区末端的区域有一个终止密码,所以可翻译出一种可溶性蛋白^[2,3]。膜结合型和可溶性FL都能刺激转染小鼠flt3的Bafl1细胞和造血前体细胞的增殖等生物学活性^[1-3]。

FL mRNA在组织细胞中广泛表达,T细胞和基质细胞表达水平比较高。虽然FL mRNA广泛表达,但正常稳态造血时,细胞膜表面和外周血清中的FL蛋白水平非常低或者检测不到。Chklovskia E等^[4]分析发现,FL在细胞内有较高水平表达,用细胞器特异性抗原抗体和FL抗体对FL进行细胞内定位发现,FL主要储存在高尔基复合体及靠近内质网的结构中。

1.2 flt3

flt3是Ⅲ型酪氨酸激酶受体家族成员之一。对flt3 mRNA的分析发现,其主要在小鼠胎肝、成年鼠胸腺、骨髓和人的胸腺、脾脏、淋巴结、骨髓组织中表达,人的肾脏、前列腺有少量表达。flt3主要表达于早期的造血细胞及一些急性白血病细胞表面,目前没有文献报道存在可溶型flt3。人类造血细胞系flt3 mRNA的检测发现,其主要是在pro-B和pre-B细胞系、粒系表达,红系、巨核系、NK(自然杀伤)细胞系和肥大细胞没有表达;各种血液系统肿瘤细胞flt3的表达亦是不同的,AML(急性粒细胞白血病)、T和B-ALL(急性淋巴细胞白血病)、混和性白血病细胞有表达,而CML(慢性粒细胞白血病)慢性期、多发性骨髓瘤、淋巴瘤没有表达^[1,2]。

1.3 FL的功能

受flt3分布的限制,FL主要作用于早期造血细胞,其主要生物学功能如下:(1)FL能促进早期造血细胞的存活、增值及分化,主要是促进粒系及淋巴细胞系的增殖,对红系、巨核系和肥大细胞几乎没有作用。体外研究发现,FL单独使用的作用较弱,但是与其他细胞因子具有协同作用,与GM-CSF(粒-巨噬细胞集落刺激因子)、M-CSF(巨噬细胞集落刺激因子)、G-CSF(粒细胞集落刺激因子)、IL-3(白细胞介素3)和SCF(干细胞因子)合用可

促进粒系祖细胞的增殖、分化;与IL-3、IL-7和IL-6协同促进淋巴系祖细胞主要是B祖细胞系的增殖分化。FL与其他细胞因子协同还可以体外扩增骨髓和脐血造血干、祖细胞,诱导HPP-CFC(高增殖潜能集落形成细胞)的体外扩增和刺激LTC-IC(长期培养启动细胞)的增殖^[1,2]。(2)FL能动员骨髓造血干细胞到外周血,是一种更有潜力的动员剂^[3]。(3)FL可以刺激DC(树突状细胞)、NK细胞、细胞毒性T细胞前体细胞分化成熟,具有肿瘤免疫治疗作用。FL促进DC前体细胞的增殖,DC是一种抗原递呈细胞,可以递呈各种抗原,包括各种肿瘤相关抗原,从而诱导T细胞特异性肿瘤免疫反应^[1,2]。FL与IL-15协同明显促进了NK前体细胞的分化,而FL单独使用对NK细胞没有作用。IL-15能促进CD34⁺的造血祖细胞向CD56⁺CD3⁺NK细胞分化,FL与IL-15协同是由于FL促进了IL-2和IL-15受体的表达,从而增加了IL-15的作用^[5]。(4)基于对树突状细胞的扩增作用,FL可作为免疫佐剂,用于疫苗的制备^[1,2]。

2 FL表达水平与骨髓造血功能的关系

骨髓造血功能障碍时,可溶性和膜结合型FL的表达水平都发生了变化,并且其水平与造血功能变化密切相关。Wonder-Filipowicz A等^[6]发现,再生障碍性贫血患者血清中FL水平的高低与骨髓中祖细胞形成集落的能力呈负相关,FL水平的高低反映了祖细胞水平上的造血能力;放疗导致骨髓造血抑制的白血病患者的血清FL水平明显高于正常对照组,其也随着造血的恢复而逐渐降低。Pfister O等^[7]观察了再生障碍性贫血患者外周血和骨髓中细胞膜结合型FL的表达,发现T细胞膜表面FL的表达显著增加,其水平与骨髓CD34⁺细胞数及集落形成能力呈负相关。

血清FL水平与白细胞的数量呈负相关,与骨髓增生程度相关。有人认为,血清FL的水平可作为干细胞数量和活性的一个参考标志^[2]。Haidar JH等^[8]研究了造血干细胞动员与自体外周血干细胞移植过程血清FL水平的变异,发现血清FL的水平可以预测造血干细胞的动员情况。Cazitt Y等^[9]的研究也得出类似的结论。MDS(骨髓增生异常综合征)是一种造血干细胞克隆性疾病,Zwierzina H等^[10]检测MDS患者血清FL水平发现,仅有48.3%的

难治性贫血血清 FL 水平明显升高,而其他各亚型患者与对照组相比没有差别,认为 FL 的水平仅在 MDS 发病的早期是升高的,其只与患者所处的疾病状态有关,与外周血细胞的数量、骨髓增生程度、细胞遗传学的异常没有关系。

骨髓造血衰竭时 FL 的水平显著升高,目前对其反应机制的研究仅是初步的。Chklovskaja E 等^[4]研究了化疗导致骨髓暂时造血障碍时 FL 表达的改变,发现 FL 由细胞内转移到了细胞膜,正常稳态造血时 FL 蛋白在高尔基复合体内呈簇集信号,而在骨髓衰竭时变成分泌后的泡状信号;可溶性和膜结合型 FL 蛋白水平呈同步升高,而细胞 FL mRNA 水平的升高倍数(7倍)明显低于蛋白升高的倍数(100倍),且迟于蛋白的升高。由此可见,FL 的浮动不是由转录水平调控的,而是由于造血干细胞损伤后胞内储存的 FL 释放引起的。Chklovskaja E 等^[11]进一步研究发现,IL-2、IL-4、IL-7 和 IL-15 能有效地诱导人类外周血 T 细胞膜结合型 FL 的表达和可溶型 FL 的释放。 γ -链是 IL-2、IL-4、IL-7 和 IL-15 受体的共有结构,这 4 个细胞因子通过 γ -链转导信号。 γ -链介导的信号以 T 细胞受体非依赖形式上调 FL 的表达,而 CsA (环孢素 A)能抑制 γ -链介导的 FL 从高尔基体转移的过程,因此,FL 的表达受 γ -链介导信号的调节,并受到 CsA 的干扰。

3 FL 在辐射造血损伤中的应用研究

3.1 辐射造血损伤与 FL 表达水平

造血组织是辐射高度敏感组织之一,照射后骨髓造血功能出现不同程度的损伤,损伤程度与受照剂量有关。对辐射剂量的快速判断是放射病分型分度诊断的关键,近年来的研究证实,FL 的水平可作为辐射诱导的骨髓早期损伤的生物学指标。Bertho JM 等^[12]研究了灵长类猕猴受照射后血浆中 FL 蛋白水平与辐射剂量和骨髓损伤的关系,发现照射剂量在 2~8Gy 时,照后一周内所有动物血浆 FL 水平都有升高,升高程度与辐射剂量有关,照后第 5 天 FL 水平与照射剂量之间呈 S 形曲线变化。在照射后 5d,照射剂量 ≥ 6 Gy 时,FL 水平较照射前升高了 10 倍;照射剂量在 2~4Gy 时,升高了 5~6 倍。因此,FL 水平可以区分受到亚致死与超致死剂量照射的动物。在中性粒细胞和血小板

数量降低之前,FL 水平就有升高,且与中性粒细胞数量呈负相关,FL 水平的升高可以推测辐射导致的骨髓造血障碍的严重程度。后来对骨髓移植患者的治疗研究发现,这几例病人血浆中 FL 水平是升高的,与外周血中中性粒细胞的数量呈负相关,证实人类临床实践的结果与动物模型得到的结果一致。因此可以清楚地看到,血浆中 FL 水平是一个很好的骨髓损伤的指标,可作为事故性辐射情况下骨髓损伤的一个有价值的生物学指标。当然,这些结果仍然需要更多的样本来证实。

FL 水平与骨髓造血恢复的关系也有报道。Blumenthal RD 等^[13]对放射免疫治疗造成骨髓造血抑制的患者血浆 FL 水平与骨髓恢复的关系作了研究,认为由骨髓细胞产生的不同细胞因子释放的改变可以预测骨髓能否从先前抑制状态中恢复,高水平刺激因子和/或低水平抑制因子使骨髓处于激活的增殖状态,而这种状态正是放化疗导致的骨髓高毒性的原因。为了确定一种能反映高毒性程度的细胞因子标志,他们测定了血浆中的 5 个细胞因子(刺激因子 SCF 和 FL,抑制因子 TNF- α 、TGF- β 和 MIP-1 α),结果,FL 对于预测毒性是最有价值的:高 FL 水平(>135 pg/mL)单独用于评价毒性时是一个最好的指标(敏感性 83%,特异性 85%,精确度 89%),与其他因子合用降低了其敏感性和精确度。高 FL 水平能反映骨髓的活性状态,从而可作为骨髓恢复的一个预测性指标。但是,Wonder-Filipowicz A 等^[14]的研究已经表明,再生障碍性贫血患者血清中 FL 水平高低与骨髓中集落形成细胞的数量呈负相关,此结论似乎与上述推论不符,高 FL 水平能否作为推测骨髓从抑制状态中恢复的指标尚需要进一步的研究。Bertho JM 等^[12]也观察了血浆 FL 水平与恢复期的关系,实验数据显示,FL 出现峰值的时间以及 FL 峰值与延迟的中性粒细胞的恢复之间并没有联系;FL 水平不能反映血小板数量的后期变化,血小板恢复的进展与 FL 水平的降低也是不一致的,这些结果可能是由于在照后输注血小板的缘故。总之,FL 水平与骨髓损伤恢复的关系尚待研究。

3.2 FL 防治辐射造血损伤的实验研究

许多具有造血和免疫刺激活性的因子对全身致死剂量照射的机体造血功能具有预防效应,FL 是一个早期的造血生长因子,单独、或与其他细胞

因子联合应用也具有辐射损伤防治作用。Hudak S 等^[14]观察了致死剂量照射的小鼠的存活率,用于评价 FL 的辐射预防作用:在 10Gy 照射之前 20h 和 2h 以及照后 4h 给予 5~20 μ g FL,发现在照前 20h 和 2h 都给予 FL 的小鼠存活率达 70%~80%,只在照前 2h 或者照后 4h 给予的存活率几乎为 0;用 FL 处理的小鼠在照后第 7 天白细胞的数量有明显的增加,到第 21 天达到一个异常高值,高于照射前水平。这些结果表明,照前给予 FL 起到明显的辐射预防作用。Hudak S 等认为,FL 保护了射线对 CFU-C(集落形成单位)的前体细胞的损伤,而不是直接参与了恢复期原始细胞的刺激作用;在第 21 天白细胞的数量达到一个高值时,小鼠仍有贫血并伴有血小板的减少,这些结果与 FL 仅作用于造血细胞的某些亚群(G-M 系祖细胞、淋巴系祖细胞)的结果是一致的。Gratwohl A 等^[15]研究发现,成年家兔经 14Gy 照射后,对照组在照射后 2 周内全部死亡;若给予 G-CSF 治疗,12.5%的动物能够存活;若给予 FL 和/或 G-CSF 治疗,91.7%的动物存活,FL 与 G-CSF 合用对辐射造血损伤治疗效果最好,认为 FL 抑制了造血干、祖细胞的凋亡而维持其存活。

Du N 等^[16]研究表明,Egr-1 启动子调控的 FL 基因疗法对受照 SCID 小鼠具有造血保护作用。FL 通过抑制细胞凋亡,能减轻辐射引起的微血管内皮细胞的损伤,而微血管内皮细胞系是一群重要的基质细胞,FL 可能在辐射损伤患者造血微环境的保护中具有应用价值。

参考文献:

- [1] Shurin MR, Esche C, Lotze MT, et al. FLT3: receptor and ligand. Biology and potential clinical application[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 1998, 9(1): 37-48.
- [2] Lyman SD, Jacobsen SE. C-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities[J]. Blood, 1998, 91(4): 1101-1134.
- [3] McClanahan T, Culpepper J, Campbell D, et al. Biochemical and genetic characterization of multiple splice variants of the Flt3 ligand[J]. Blood, 1996, 88(9): 3371-3382.
- [4] Chklovskaja E, Jansen W, Nissen C, et al. Mechanism of flt3 ligand expression in bone marrow failure: translocation from intracellular stores to the surface of T lymphocytes after chemotherapy-induced suppression of hematopoiesis[J]. Blood, 1999, 93(8): 2595-2604.
- [5] Yu H, Fehniger TA, Fuchshuber P, et al. Flt3 ligand promotes the generation of a distinct CD34 (+) human natural killer cell progenitor that responds to interleukin-15[J]. Blood, 1998, 92(10): 3647-3657.
- [6] Wonder-Filipowicz A, Lyman SD, Gratwohl A, et al. Flt3 ligand level reflects hematopoietic progenitor cell function in aplastic anemia and chemotherapy-induced bone marrow aplasia[J]. Blood, 1996, 88(12): 4493-4499.
- [7] Pfister O, Chklovskaja E, Jansen W, et al. Chronic overexpression of membrane-bound flt3 ligand by T lymphocytes in severe aplastic anemia[J]. Br J Haematol, 2000, 109(1): 211-220.
- [8] Haidar JH, Bazarbachi A, Mahfouz R, et al. Serum Flt3 ligand and variation as a predictive indicator of hematopoietic stem cell mobilization[J]. J Hematother Stem Cell Res, 2002, 11(3): 533-538.
- [9] Gazitt Y, Liu Q. High steady-state plasma levels of flt3-ligand in the peripheral blood is a good predictor for poor mobilization of CD34+ PBSC in patients undergoing high-dose chemotherapy and stem cell rescue[J]. J Hematother Stem Cell Res, 2000, 9(2): 285-293.
- [10] Zwierzina H, Anderson JE, Rollinger-Holzinger I, et al. Endogenous FLT-3 ligand serum levels are associated with disease stage in patients with myelodysplastic syndromes[J]. Leukemia, 1999, 13(4): 553-557.
- [11] Chklovskaja E, Nissen C, Landmann I, et al. Cell-surface trafficking and release of flt3 ligand from T lymphocytes is induced by common cytokine receptor (γ -chain signaling and inhibited by cyclosporin A[J]. Blood, 2001, 97(4): 1027-1034.
- [12] Bertho JM, Demarquay C, Frick J, et al. Level of Flt3-ligand in plasma: a possible new bio-indicator for radiation-induced aplasia[J]. Int J Radiat Biol, 2001, 77(6): 703-712.
- [13] Blumenthal RD, Walter L, Malik J, et al. Plasma FLT3-L levels predict bone marrow recovery from myelosuppressive therapy[J]. Cancer, 2000, 88(2): 333-343.
- [14] Hudak S, Leach MW, Xu Y, et al. Radioprotective effects of flk2/flt3 ligand[J]. Exp Hematol, 1998, 26(6): 515-522.
- [15] Gratwohl A, John L, Baldomero H, et al. FLT-3 ligand provides hematopoietic protection from total body irradiation in rabbits[J]. Blood, 1998, 92(3): 765-769.
- [16] Du N, Feng K, Luo CJ, et al. Radioprotective effect of FLT3 ligand expression regulated by Egr-1 regulated element on radiation injury of SCID mice[J]. Exp Hematol, 2003, 31(3): 191-196.