

·基础研究·

不同年龄小鼠造血系统辐射损伤与修复的比较观察

陈孟毅¹ 林帅^{1,2} 吴丽贤² 刘冰¹ 李程程¹ 李德冠³ 孟爱民¹

¹中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京协和医学院比较医学中心, 国家卫生健康委员会人类疾病比较医学重点实验室, 北京 100021; ²福建医科大学药学院, 福建省天然药物药理学重点实验室, 福州 350108; ³中国医学科学院放射医学研究所, 天津市放射医学与分子核医学重点实验室, 天津 300192

陈孟毅现在原子高科股份有限公司

通信作者: 李德冠, Email: ldguan@163.com;

孟爱民, Email: ai_min_meng@126.com

【摘要】 目的 观察辐射对不同年龄小鼠(幼年鼠、青年鼠、老年鼠)造血系统的损伤及恢复的影响, 探讨幼年鼠、老年鼠受照后造血系统的变化及其与青年鼠的差异。方法 不同年龄(幼年鼠: 3周龄、青年鼠: 8周龄、老年鼠: 14月龄)雄性 C57BL/6 小鼠各 60 只, 按照随机区组法分为对照组、2 Gy 照射组、4 Gy 照射组, 每组各 20 只。其中, 照射组小鼠用¹³⁷Cs γ 射线给予全身照射, 对照组给予假照射。分别于照射后第 3、7、14、28 天取材, 检测小鼠外周血计数、单侧股骨骨髓有核细胞计数、骨髓中造血干细胞(HSC)百分比、造血祖细胞(HPC)百分比及粒单系造血祖细胞集落形成单位(CFU-GM)绝对百分比。多组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用 *t* 检验。结果 照射组小鼠白细胞计数、单侧股骨骨髓有核细胞计数、HSC 百分比和 HPC 百分比在第 3 天降至最低值, 其中, 幼年鼠 2 Gy、4 Gy 照射组白细胞计数分别下降至同组对照组的 34.8% ($t=6.129, P<0.05$)、19.6% ($t=7.084, P<0.05$), 青年鼠 2 Gy、4 Gy 照射组白细胞计数分别下降至同组对照组的 43.8% ($t=3.043, P<0.05$)、20.0% ($t=7.084, P<0.05$), 老年鼠 2 Gy、4 Gy 照射组白细胞计数分别下降至同组对照组的 19.0% ($t=22.080, P<0.05$)、8.4% ($t=24.590, P<0.05$), 4 Gy 照射组降低程度重于 2 Gy 照射组, 且呈剂量依赖性。第 28 天时幼年鼠照射组单侧股骨骨髓有核细胞计数未恢复正常, 4 Gy 照射组 HSC 绝对百分比仍低于 50%, HPC 绝对百分比恢复至 50% 左右。青年鼠照射组 CFU-GM 在第 28 天恢复至正常水平, 而幼年鼠照射组(2 Gy 照射: $t=2.067, P<0.05$; 4 Gy 照射: $t=3.358, P<0.05$)和老年鼠照射组(2 Gy 照射: $t=2.586, P<0.05$; 4 Gy 照射: $t=4.772, P<0.05$)在第 28 天时显著低于青年鼠照射组, 仍未恢复至正常水平。结论 照射组小鼠造血系统大多数指标在第 3 天出现急性抑制且呈剂量依赖性, 3 d 后为损伤恢复期, 多数指标在第 28 天可恢复至正常水平。与青年鼠相比, 幼年鼠的血小板和造血干细胞功能对辐射损伤更为敏感, 老年鼠的骨髓细胞增殖功能恢复能力下降。

【关键词】 小鼠; 辐射损伤; 造血系统; 修复; 年龄差异

基金项目: 国家自然科学基金(81372928、81573094); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(2017-I2M-3-015); 国家重点研发计划(2017YFA0105200)

DOI: [10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2019.05.011](https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2019.05.011)

Comparison of radiation damage and recovery of hematopoietic system in mice of different ages

Chen Mengyi¹, Lin Shuai^{1,2}, Wu Lixian², Liu Bing¹, Li Chengcheng¹, Li Deguan³, Meng Aimin¹

¹Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, National Health Commission, Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College, Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China; ²Fujian Key Laboratory of Natural Medicine

Pharmacologys, College of Pharmacy, Fujian Medical University, Fuzhou 350108, China; ³Tianjin Key Laboratory of Radiation Medicine and Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Science, Tianjin 300192, China

Chen Mengyi is working on HTA Co., Ltd.

Corresponding author: Li Deguan, Email: ldguan@163.com;

Meng Aimin, Email: ai_min_meng@126.com

[Abstract] Objective To observe and compare the effects of radiation on the damage and recovery of hematopoietic system in mice of different ages (juvenile, adult, and aged mice). **Methods** Sixty male C57BL/6 mice of various ages were randomly divided into control, 2 Gy irradiation, and 4 Gy irradiation groups. The control group received sham irradiation, and the other two were administered with ¹³⁷Cs γ total body irradiation. On the 3rd, 7th, 14th, and 28th days after irradiation, peripheral blood was collected, white blood cells, red blood cells and platelets were counted, unilateral femur bone marrow nucleated cell counts were determined, and percentages of hematopoietic stem cell (HSC), hematopoietic progenitor cell (HPC) and colony forming unit-granulocyte macrophage were calculated. One way ANOVA was used for comparison among groups, while *t* test was used for comparison between two groups. **Results** White blood cell count, unilateral femur bone marrow nucleated cell count, hematopoietic stem cell and progenitor cell count of irradiated mice were reduced to the lowest values on the 3rd day. Compared with the control group, the white blood cell count of juvenile mice decreased to 34.8% (2 Gy irradiation) ($t=6.129$, $P<0.05$) and 19.6% (4 Gy irradiation) ($t=7.084$, $P<0.05$), while adult mice decreased to 43.8% (2 Gy irradiation) ($t=3.043$, $P<0.05$) and 20.0% (4 Gy irradiation) ($t=7.084$, $P<0.05$), aged mice decreased to 19.0% (2 Gy irradiation) ($t=22.080$, $P<0.05$) and 8.4% (4 Gy irradiation) ($t=24.590$, $P<0.05$). The decrease in 4 Gy group was more serious than that in 2 Gy group in a dose-dependent manner. At 28th day after irradiation, unilateral femur bone marrow nucleated cell count in irradiated juvenile mice did not return to normal, the HSC percentage in the juvenile mice of 4 Gy group was still lower than 50%, and the HPC percentage of irradiated juvenile mice recovered to approximately 50% of that of the control group. At 28th day after irradiation, the percentage of colony forming unit-granulocyte macrophage returned to normal for the irradiated adult mice, however, the irradiated juvenile mice (2 Gy irradiation: $t=2.067$, $P<0.05$; 4 Gy irradiation: $t=3.358$, $P<0.05$) and aged mice (2 Gy irradiation: $t=2.586$, $P<0.05$; 4 Gy irradiation: $t=4.772$, $P<0.05$) were significantly lower than those of adult mice, which did not return to normal level. **Conclusions** After irradiation, majority of the hematopoietic system of the irradiated group showed acute, dose-dependent inhibition on the 3rd day. After the recovery period, most of the indicators returned to normal values on the 28th day. The results suggest that the hematopoietic stem cell functions in juvenile mice are more sensitive to radiation injury and poorly recover after radiation compared with those in adult mice. In addition, the recovery for bone marrow cell proliferation was decreased in aged mice.

[Key words] Mice; Radiation injuries; Hematopoietic system; Repair; Age difference

Fund programs: National Natural Science Foundation of China (81372928, 81573094); CAMS Innovation Fund for Medical Sciences (2017-I2M-3-015); National Key Research and Development Program of China (2017YFA0105200)

DOI: [10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2019.05.011](https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2019.05.011)

目前, 肿瘤的发病率持续上升^[1-2], 治疗方法包括手术治疗、化疗、放疗^[3]和靶向治疗^[4]。临床上大部分肿瘤患者需要接受放疗^[5]。放疗在对癌细胞进行杀伤的同时也对正常细胞造成了辐射损伤。

辐射损伤后造血及免疫功能恢复迟缓是放疗最严重的不良反应之一^[6]。造血系统对辐射高度敏感^[7], 儿童和老人的造血系统较青壮年对辐射更加敏感^[8-9]。本研究观察辐射对不同年龄小鼠(幼年鼠、

青年鼠、老年鼠)造血系统的损伤和恢复的影响,探讨幼年鼠、老年鼠受照后造血系统的反应性与青年鼠的差异,以期为儿童和老人的辐射防护提供参考。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂与仪器

^{137}Cs γ 射线照射源(GAMMA-CELL40)为加拿大原子能有限公司产品,剂量率为 0.873 Gy/min;流式细胞仪(C6)为美国 BD 公司产品;全自动血液分析仪(MEK-7222K)为日本光电工业株式会社产品。Biotin-B220、Biotin-Gr-1、Biotin-Ter119、Biotin-CD4、Biotin-CD8a、Biotin-CD11b、Sca-1-PE、c-kit-APC 购自美国 eBioscience 公司,Streptavidin-Percp 购自美国 Biologend 公司。

1.2 实验动物

幼年(3 周龄,10 g 左右)、青年(8 周龄,22 g 左右)、老年(14 月龄,30 g 左右)雄性 C57BL/6 小鼠(无特定病原体级)各 60 只,购于北京华阜康生物科技股份有限公司(合格证号:SCXK(京)2014-0004),饲养于中国医学科学院放射医学研究所动物房屏障环境内。

1.3 动物分组

将实验小鼠按照随机区组法分为对照组、2 Gy 照射组、4 Gy 照射组,每组各 20 只。其中,照射组小鼠给予一次性全身 ^{137}Cs γ 射线照射,吸收剂量为 2 Gy、4 Gy,照射剂量率为 0.873 Gy/min,对照组给予假照射(即不照射)。分别于照射后第 3、7、14、28 天取材。实验过程中,所有动物在同等条件下饲养,自由饮水和摄食。

1.4 外周血计数

取 0.5 mL 外周血用乙二胺四乙酸-K3 抗凝,用全自动血细胞计数仪测定 WBC、RBC 和血小板(blood platelet, PLT)计数。

1.5 单侧股骨骨髓有核细胞分离计数

无菌分离小鼠单侧股骨,用含 2% 胎牛血清的 PBS 将骨髓细胞冲出并进行细胞计数。

1.6 骨髓细胞分型检测

取 10^6 个骨髓细胞,加入 Biotin-B220、Biotin-Gr-1、Biotin-Ter119、Biotin-CD4、Biotin-CD8a、Biotin-CD11b 抗体与 PBS 的混合液 4 μL ,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min,洗涤 1 次后弃上清;加入 Sca-1-PE、

c-kit-APC、Streptavidin-Percp 抗体与 PBS 的混合液 4 μL ,室温避光染色 20 min,加入 1 mL 含 2% 胎牛血清的 PBS,1000 r/min 离心 5 min(离心半径为 35 cm)后弃上清,加入 300 μL PBS 重悬细胞,用流式细胞仪检测造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)($\text{Lin}^{-}\text{c-kit}^{+}\text{Sca1}^{+}$)、造血祖细胞(hematopoietic progenitor cell, HPC)($\text{Lin}^{-}\text{c-kit}^{+}\text{Sca1}^{-}$)占小鼠体内总细胞的百分比。

单侧股骨 HSC 绝对百分比=(照射组 HSC 百分比 \times 单侧股骨细胞计数)/(同组对照组 HSC 百分比 \times 单侧股骨细胞计数) $\times 100\%$;

单侧股骨 HPC 绝对百分比=(照射组 HPC 百分比 \times 单侧股骨细胞计数)/(同组对照组 HPC 百分比 \times 单侧股骨细胞计数) $\times 100\%$

1.7 粒单系造血祖细胞集落形成单位(colony forming unit-granulocyte macrophage, CFU-GM)的测定

将同组小鼠骨髓细胞悬液混合计数,取 1×10^4 个(对照组)、 2×10^4 个(2 Gy 照射组)、 4×10^4 个(4 Gy 照射组)骨髓细胞至 2 mL 甲基纤维素培养基(M3534)中,振荡器充分混匀,用 2 mL 注射器连接 16#平头注射器针头,吸取细胞混悬液,加入 12 孔板,每组 6 个复孔,每孔 0.5 mL。轻摇培养板,使培养基均匀分布。置入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 7 d 后,在倒置显微镜下采用低倍镜观察集落形成情况,细胞数 ≥ 50 个为 1 个集落。

CFU-GM 绝对百分比=照射组阳性集落数/同组对照组阳性集落数 $\times 100\%$

1.8 统计学方法

采用 Prism5 软件对数据进行分析。计量资料符合正态分布,以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,在方差齐的条件下,组间两两比较采用 t 检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 辐射对小鼠外周血计数的影响

不同剂量照射后,不同年龄小鼠的损伤程度不同。由表 1 可知,3 组小鼠的 WBC 均在第 3 天降至最低值,其中 4 Gy 照射组降低程度重于同组 2 Gy 照射组,且呈剂量依赖性。第 3 天时,幼年鼠 2 Gy、4 Gy 照射组 WBC 分别下降至同组对照

组的34.8%、19.6%；青年鼠2 Gy、4 Gy照射组下降至同组对照组的43.8%、20.0%；老年鼠2 Gy、4 Gy照射组下降至同组对照组的19.0%、8.4%。之后逐渐恢复，在第28天时3组小鼠的WBC基本上恢复至正常水平。由表2可知，幼年鼠2 Gy照射组RBC在第3天时低于同组对照组，4 Gy照射组在第3、14天时RBC显著低于同组对照组，第14天

时低于2 Gy照射组；老年鼠2 Gy照射组RBC在第7、14天时低于同组对照组，4 Gy照射组在第3、7、14天时低于同组对照组，且在第7、14天时低于2 Gy照射组。第28天时3组小鼠RBC均恢复至接近对照组水平。由表3可知，幼年鼠2 Gy、4 Gy照射组PLT在第14、28天时低于同组对照组；而青年鼠照射组和老年鼠照射组与同组对

表1 辐射对不同年龄小鼠外周血白细胞计数的影响 $[(\bar{x}\pm s)\times 10^9/L](n=5)$

Table 1 Effects of radiation on white blood cell count in peripheral blood in mice of different ages $[(\bar{x}\pm s)\times 10^9/L](n=5)$

组别	照射后时间			
	第3天	第7天	第14天	第28天
幼年鼠(3周龄)				
对照组	4.60±0.95	7.15±0.75	6.50±0.30	4.55±0.65
2 Gy照射组	1.58±0.13 ^a	3.72±0.65 ^a	4.30±0.14 ^a	3.90±0.25
4 Gy照射组	0.94±0.34 ^{a,b}	2.30±0.49 ^{a,b}	2.16±0.78 ^{a,b}	4.42±0.45
青年鼠(8周龄)				
对照组	4.50±0.10	6.50±0.40	3.60±0.10	3.00±0.20
2 Gy照射组	1.97±0.87 ^a	3.52±0.43	6.45±1.17 ^a	6.20±0.69 ^a
4 Gy照射组	0.93±0.13 ^a	1.72±0.31 ^{a,b}	2.96±0.39 ^b	3.64±0.65 ^b
老年鼠(14月龄)				
对照组	8.85±0.11	8.05±0.55	9.65±0.65	7.75±1.45
2 Gy照射组	1.68±0.17 ^a	3.90±0.61 ^a	3.90±0.61 ^a	4.64±1.02 ^a
4 Gy照射组	0.74±0.19 ^{a,b}	3.10±0.72 ^{a,b}	3.10±0.72 ^a	5.00±1.73

注：表中，^a：与同组对照组相比， $2.717\leq t\leq 24.590$ ，均 $P<0.05$ ；^b：与同组2 Gy照射组相比， $2.822\leq t\leq 7.431$ ，均 $P<0.05$ 。

表2 辐射对不同年龄小鼠外周血红细胞计数的影响 $[(\bar{x}\pm s)\times 10^{12}/L](n=5)$

Table 2 Effects of radiation on red blood cell count in peripheral blood in mice of different ages $[(\bar{x}\pm s)\times 10^{12}/L](n=5)$

组别	照射后时间			
	第3天	第7天	第14天	第28天
幼年鼠(3周龄)				
对照组	8.36±0.47	8.25±0.27	8.94±0.07	9.06±0.21
2 Gy照射组	7.38±0.37 ^a	8.23±0.20	8.93±0.10	9.03±0.19
4 Gy照射组	7.01±0.13 ^a	7.95±0.38	7.94±0.22 ^{a,b}	8.35±0.91
青年鼠(8周龄)				
对照组	8.36±0.47	8.71±1.25	9.14±0.02	9.80±0.01
2 Gy照射组	7.70±3.38	7.94±0.36	9.17±0.18	10.42±0.37
4 Gy照射组	8.04±0.51	7.75±0.38	8.32±0.22 ^{a,b}	9.70±0.24 ^b
老年鼠(14月龄)				
对照组	8.55±0.11	9.77±0.23	8.69±0.10	8.53±0.34
2 Gy照射组	8.22±0.39	8.09±0.17 ^a	8.22±0.42	9.09±0.58
4 Gy照射组	7.96±0.34	7.24±0.21 ^{a,b}	7.21±0.28 ^{a,b}	8.40±0.57

注：表中，^a：与同组对照组相比， $3.064\leq t\leq 12.000$ ，均 $P<0.05$ ；^b：与同组2 Gy照射组相比， $3.282\leq t\leq 7.454$ ，均 $P<0.05$ 。

表3 辐射对不同年龄小鼠外周血血小板计数的影响 $[(\bar{x}\pm s)\times 10^9/L](n=5)$

Table 3 Effects of radiation on platelet count in peripheral blood in mice of different ages $[(\bar{x}\pm s)\times 10^9/L](n=5)$

组别	照射后时间			
	第3天	第7天	第14天	第28天
幼年鼠(3周龄)				
对照组	477.00±31.76	455.00±60.00	516.00±26.00	505.50±13.50
2 Gy照射组	483.80±41.50	383.80±35.31	346.25±22.07 ^a	359.25±39.38 ^a
4 Gy照射组	547.40±136.63	258.20±95.96 ^b	311.60±32.77 ^a	368.60±51.66 ^a
青年鼠(8周龄)				
对照组	377.79±29.79	292.50±25.50	512.50±20.50	447.50±3.50
2 Gy照射组	590.67±261.81 ^a	375.60±64.26	381.75±57.60 ^a	474.80±81.93
4 Gy照射组	435.50±63.26	292.20±47.07	287.20±63.13	547.60±71.37
老年鼠(14月龄)				
对照组	641.50±18.50	709.50±111.50	822.00±47.00	692.00±112.00
2 Gy照射组	702.80±195.68	759.40±143.19	868.00±176.50	750.60±154.56
4 Gy照射组	664.80±48.55	593.40±73.79	1 258.20±66.05 ^{a,b}	744.60±262.76

注：表中，^a：与同组对照组相比， $3.125\leq t\leq 7.198$ ，均 $P<0.05$ ；^b：与同组2 Gy照射组相比， $2.457\leq t\leq 4.669$ ，均 $P<0.05$ 。

照组相比无明显变化。

2 Gy、4 Gy 照射后,小鼠外周血 RBC 和 PLT 未发生明显改变, WBC 降低较为明显,且幼年鼠和老年鼠 WBC 损伤较青年鼠严重。幼年鼠 2 Gy 照射组 WBC 在第 3 天时为对照组的 34.8%,第 7 天时恢复至对照组的 52%,4 Gy 照射组 WBC 在第 3 天时为对照组的 19.6%,第 7 天时恢复至对照组的 32%;老年鼠 2 Gy 照射组 WBC 在第 3 天时为对照组的 19%,第 7 天时恢复至对照组的 48%,4 Gy 照射组 WBC 在第 3 天时为对照组的 8.4%,第 7 天时恢复至对照组的 38.5%,这表明老年鼠在受到辐射损伤后 WBC 的恢复能力优于幼年鼠。

2.2 辐射对小鼠单侧股骨骨髓有核细胞计数的影响

小鼠的单侧股骨骨髓有核细胞计数可以在一定程度上反映骨髓的造血能力。由表 4 可知,受照后,3 组小鼠的单侧股骨骨髓有核细胞计数均在 3 天下降至最低值,4 Gy 照射组下降程度高于 2 Gy 照射组,呈剂量依赖性。第 3 天时,幼年鼠 2 Gy 照射组和 4 Gy 照射组分别下降至同组对照组的 44.5%、14.2%,青年鼠 2 Gy 照射组和 4 Gy 照射组分别下降至同组对照组的 74.8%、25.4%,老

表 4 辐射对不同年龄小鼠单侧股骨骨髓有核细胞计数的影响 $[(\bar{x}\pm s)\times 10^6/L](n=5)$

Table 4 Effects of radiation on the count of unilateral femur bone marrow nucleated cell in mice of different ages $[(\bar{x}\pm s)\times 10^6/L](n=5)$

组别	照射后时间			
	第3天	第7天	第14天	第28天
幼年鼠(3周龄)				
对照组	20.30±2.05	24.60±5.40	20.40±0.00	26.00±0.40
2 Gy照射组	9.04±1.06 ^a	22.48±4.21	21.10±6.61	18.20±3.30
4 Gy照射组	2.88±0.47 ^{a,b}	15.84±2.54	15.28±2.52	16.08±2.90 ^a
青年鼠(8周龄)				
对照组	31.40±3.00	31.60±0.00	35.20±10.00	35.40±9.40
2 Gy照射组	23.47±0.50 ^a	33.28±5.30	28.70±3.09	42.40±4.74
4 Gy照射组	8.00±0.75 ^{a,b}	26.80±2.37	21.12±2.53 ^b	45.12±7.10
老年鼠(14月龄)				
对照组	36.50±14.50	34.80±8.40	44.60±2.20	39.20±3.60
2 Gy照射组	19.40±3.67	45.60±2.47	33.00±3.56 ^a	44.40±6.28
4 Gy照射组	12.80±2.71 ^a	35.52±12.20	23.84±4.85 ^{a,b}	40.08±2.56

注:表中,^a:与同组对照组相比, $2.532\leq t\leq 16.260$,均 $P<0.05$; ^b:与同组 2 Gy 照射组相比, $2.532\leq t\leq 26.200$,均 $P<0.05$ 。

年鼠 2 Gy 照射组和 4 Gy 照射组分别下降至同组对照组的 53.2%、35.1%,这表明幼年鼠和老年鼠的损伤程度重于青年鼠。第 28 天时,青年鼠和老年鼠的单侧股骨骨髓有核细胞计数已恢复至接近同组对照组水平,而幼年鼠 2 Gy 照射组和 4 Gy 照射组在第 28 天时未恢复正常,这提示在相同剂量的辐射照射下,幼年鼠的损伤程度较重、恢复较慢。

2.3 辐射对小鼠骨髓 HSC 和 HPC 的影响

小鼠骨髓细胞中的 HSC 和 HPC 数量的变化与造血功能密切相关。由表 5 可知,受照后,幼年鼠照射组第 3 天时 HSC 显著下降,4 Gy 照射组的下降程度高于 2 Gy 照射组,且呈剂量依赖性,2 Gy 照射组在第 28 天时恢复至正常水平,4 Gy 照射组恢复较慢,第 28 天时 HSC 仍低于 2 Gy 照射组,仅恢复至同组对照组的 40.9%。青年鼠照射组第 3 天和第 7 天时 HSC 较低,2 Gy 照射组在第 14 天恢复正常水平,4 Gy 照射组在第 28 天恢复正常水平。老年鼠照射组第 7 天时 HSC 显著低于同组对照组,但第 14 天时已逐渐恢复至正常水平。

由图 1 和表 5 可见,照射组小鼠在第 3 天时 HSC 绝对百分比几乎为最低,之后逐渐恢复,第 28 天时,2 Gy 照射的 3 组小鼠的 HSC 基本恢复至正常水平,而 4 Gy 照射的仅青年鼠和老年鼠的

表 5 辐射对小鼠骨髓细胞中造血干细胞百分比的影响 $(\bar{x}\pm s)$ (n=5)

Table 5 Effects of radiation on hematopoietic stem cells in mice bone marrow cells $(\bar{x}\pm s)$ (n=5)

组别	照射后时间			
	第3天	第7天	第14天	第28天
幼年鼠(3周龄)				
对照组	0.42±0.03	0.35±0.05	0.18±0.00	0.22±0.05
2 Gy照射组	0.15±0.04 ^a	0.25±0.03 ^a	0.06±0.03 ^a	0.31±0.09
4 Gy照射组	0.01±0.00 ^{a,b}	0.16±0.02 ^{a,b}	0.13±0.05	0.09±0.04 ^{a,b}
青年鼠(8周龄)				
对照组	0.27±0.05	0.28±0.04	0.26±0.04	0.24±0.00
2 Gy照射组	0.07±0.03 ^a	0.02±0.01 ^a	0.24±0.06	0.24±0.03
4 Gy照射组	0.03±0.01 ^b	0.04±0.01 ^a	0.12±0.06 ^a	0.24±0.04
老年鼠(14月龄)				
对照组	0.20±0.03	0.30±0.02	0.17±0.02	0.21±0.04
2 Gy照射组	0.14±0.04	0.11±0.02 ^b	0.18±0.16	0.17±0.07
4 Gy照射组	0.11±0.03	0.12±0.04 ^a	0.22±0.05	0.32±0.11

注:表中,^a:与同组对照组相比, $4.723\leq t\leq 25.660$,均 $P<0.05$; ^b:与同组 2 Gy 照射组相比, $4.650\leq t\leq 7.399$,均 $P<0.05$ 。

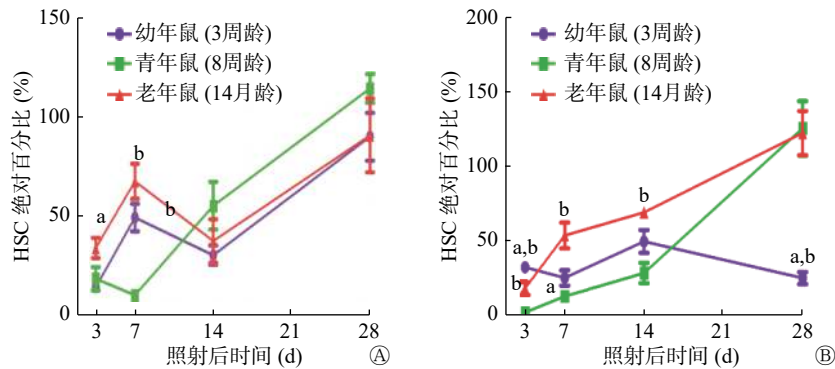


图1 照射后小鼠骨髓细胞中HSC绝对百分比的变化 图中, A: 2 Gy照射; B: 4 Gy照射。HSC: 造血干细胞。b: 与青年鼠照射组相比, $3.280 \leq t \leq 9.684$, 均 $P < 0.05$; a: 与老年鼠照射组相比, $2.639 \leq t \leq 6.293$, 均 $P < 0.05$ 。

Fig. 1 Changes of hematopoietic stem cells absolute percentage in mice bone marrow cells after irradiation

HSC恢复至正常水平, 幼年鼠HSC绝对百分比低于50%, 显著低于青年鼠和老年鼠, 这表明幼年鼠照射后损伤较重, 恢复较慢。

由表6可知, 照射组小鼠在第3天时HPC百分比低, 4 Gy照射组下降程度高于2 Gy照射组, 且呈剂量依赖性。之后逐渐恢复, 第28天时3组小鼠HPC均接近正常水平。由图2和表6可见, 受照后, 3组小鼠HPC绝对百分比在第3天下降至最低值, 青年鼠和老年鼠在第28天时已恢复至接近同组对照组水平, 幼年鼠恢复较慢, 仅恢复至同组对照组的50%左右。

由此可见, 相比于青年鼠和老年鼠, 幼年鼠的造血系统对辐射损伤更为敏感, 受照后损伤更严重, 恢复较差。

2.4 辐射对小鼠骨髓细胞增殖功能的影响

由图3中A可见, 幼年鼠对照组的CFU-GM阳性集落数显著低于青年鼠对照组, 老年鼠对照组CFU-GM阳性集落数显著高于幼年鼠和青年鼠对照组。图3中B和C显示, 受照后, 青年鼠CFU-GM

表6 辐射对小鼠骨髓细胞中造血祖细胞百分比的影响($\bar{x} \pm s$) (n=5)

Table 6 Effects of radiation on hematopoietic progenitor cells in mice bone marrow cells ($\bar{x} \pm s$) (n=5)

组别	照射后时间			
	第3天	第7天	第14天	第28天
幼年鼠(3周龄)				
对照组	0.22±0.08	0.22±0.01	0.10±0.02	0.27±0.03
2 Gy照射组	0.13±0.08 ^a	0.17±0.02 ^a	0.06±0.02	0.27±0.01
4 Gy照射组	0.02±0.01 ^a	0.14±0.02 ^b	0.05±0.02	0.25±0.06
青年鼠(8周龄)				
对照组	0.32±0.13	0.23±0.04	0.24±0.04	0.26±0.04
2 Gy照射组	0.02±0.01	0.03±0.01	0.15±0.01	0.25±0.02
4 Gy照射组	0.01±0.01	0.02±0.02	0.11±0.01	0.29±0.05
老年鼠(14月龄)				
对照组	1.26±0.09	0.16±0.02	0.24±0.02	0.32±0.01
2 Gy照射组	0.53±0.10 ^a	0.11±0.02	0.25±0.11	0.36±0.06
4 Gy照射组	0.18±0.04 ^{a,b}	0.21±0.07 ^b	0.20±0.00	0.32±0.11

注: 表中, ^a: 与同组对照组相比, $2.685 \leq t \leq 19.100$, 均 $P < 0.05$; ^b: 与同组2 Gy照射组相比, $2.861 \leq t \leq 6.268$, 均 $P < 0.05$ 。

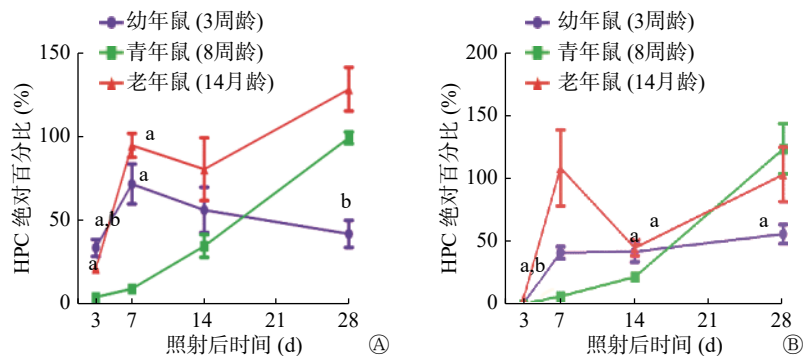


图2 照射后小鼠骨髓细胞中HPC绝对百分比的变化 图中, A: 2 Gy照射; B: 4 Gy照射。a: 与青年鼠照射组相比, $2.473 \leq t \leq 5.598$, 均 $P < 0.05$ 。b: 与老年鼠照射组相比, $2.766 \leq t \leq 5.539$, 均 $P < 0.05$ 。

Fig. 2 Changes of hematopoietic progenitor cells absolute percentage in mice bone marrow cells after irradiation

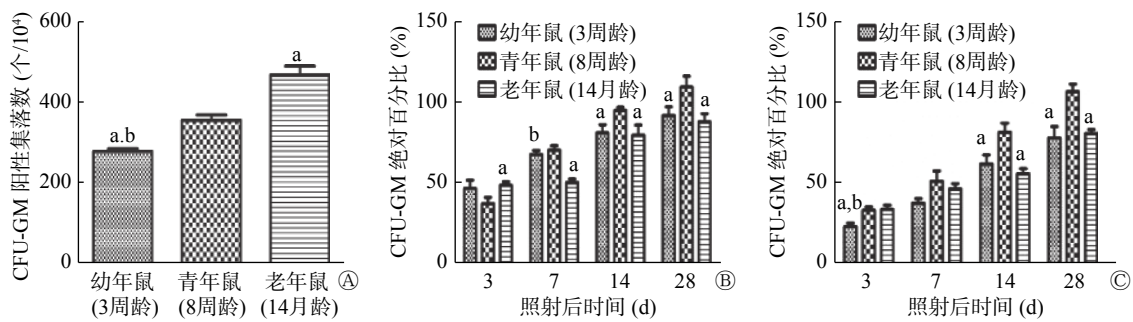


图3 照射后小鼠骨髓细胞增殖功能的变化 图中, A: 不同年龄的健康对照小鼠 CFU-GM 阳性集落数; B: 2 Gy 照射对小鼠骨髓细胞增殖功能的影响; C: 4 Gy 照射对小鼠骨髓细胞增殖功能的影响。CFU-GM: 粒单核造血祖细胞集落形成单位。*: 与青年鼠照射组相比, $2.302 \leq t \leq 5.604$, 均 $P < 0.05$; b: 与老年鼠照射组相比, $3.019 \leq t \leq 5.194$, 均 $P < 0.05$ 。

Fig. 3 Changes of proliferation function of mice bone marrow cells after irradiation

绝对百分比在第3天下降至最低值, 4 Gy 照射组的下降程度高于 2 Gy 照射组, 且呈剂量依赖性, 在第28天时恢复至正常水平。与青年鼠相比, 幼年鼠照射组和老年鼠照射组 CFU-GM 绝对百分比在第28天时显著低于青年鼠, 未恢复至正常水平。由此可见, 与青年鼠相比, 照射后, 幼年鼠和老年鼠骨髓细胞的增殖能力减弱, 损伤后恢复能力减慢。

3 讨论

恶性肿瘤是一类与衰老有关的疾病^[10-11], 近年来其发病率逐年增加^[12]。恶性肿瘤的发病多在50岁以后, 以中老年人较为常见。老年人肿瘤发生的危险程度是中青年人的11倍^[13]。理化因素、生物因素等在儿童恶性肿瘤的发病中起着重要作用, 美国儿童恶性肿瘤的发病率从1975年的11.5/10万上升至2002年的14.6/10万^[14]。放疗在对癌细胞进行杀伤的同时也对正常细胞造成辐射损伤, 损伤后造血系统功能恢复迟缓^[15], 儿童和老年人的造血系统较青壮年更加敏感, 临床上主要通过调整辐射剂量来减轻对儿童和老年人的损伤^[16]。

本研究结果表明, 受照后, 不同年龄的3组小鼠的多数指标在前3天出现急性抑制现象, 且呈剂量依赖性。与青年鼠相比, 幼年鼠 WBC 损伤更重且恢复较差, 提示受照后幼年鼠在固有免疫方面比青年鼠敏感。幼年鼠单侧股骨骨髓有核细胞计数下降较为明显, 损伤较重且恢复较慢, 4 Gy 照射组 HSC 绝对百分比在第28天恢复至50%, 2 Gy 和 4 Gy 照射组 HPC 绝对百分比在第28天恢复至50%左右, 幼年鼠 CFU-GM 预后较差, 提示受照后幼年鼠造血系统比青年鼠更敏感, 功能尚未发育

健全。老年鼠 WBC 损伤更重且预后较差, 提示受照后老年鼠在固有免疫方面较青年鼠敏感。老年鼠 CFU-GM 预后较差, 提示受照后老年鼠造血系统比青年鼠更敏感。

总之, 与青年鼠相比, 受照后幼年鼠外周血 RBC 和 PLT 未发生明显改变, WBC、单侧股骨骨髓有核细胞计数、HSC 百分比、HPC 百分比、CFU-GM 绝对百分比等减少较为严重, 恢复较慢甚至不能完全恢复; 老年鼠 WBC 比青年鼠和幼年鼠损伤更为严重, 单侧股骨骨髓有核细胞计数、HSC 百分比、HPC 百分比在第28天时基本恢复正常, 而 CFU-GM 绝对百分比低于青年鼠, 提示老年鼠骨髓细胞的增殖能力减弱。本研究结果提示, 根据不同年龄小鼠辐射损伤的特点应该给予不同的治疗手段, 如幼年鼠对辐射较为敏感, 照射后易受损伤, 故幼年鼠在照射后需及时监测受损情况, 若损伤较重需要适当降低照射剂量, 若恢复较慢可以适当给予促进恢复的治疗; 老年鼠则需注意功能恢复情况。

临床上, 辐射损伤后造血及免疫功能恢复迟缓是导致急性辐射损伤综合征患者死亡的主要原因。辐射剂量越大, 造血及免疫功能受损越严重^[17]。此前, 针对不同年龄的放疗患者, 调整辐射剂量可能是更需考虑的问题, 但放疗对不同年龄患者造血系统损伤的差异需要进行系统研究。我们为了比较年龄差异对辐射导致造血系统损伤修复作用的影响, 选用了 2 Gy 和 4 Gy 分别观察不同年龄的辐射损伤模型小鼠对辐射损伤反应性的差异, 为临床照射剂量的选择和临床监护提供了实验基础。

利益冲突 本研究由署名作者按以下贡献声明独立开展, 不涉及任

何利益冲突。

作者贡献声明 陈孟毅负责现场取材及实验、数据收集及整理、论文撰写；林帅负责现场取材及实验、数据收集及整理；吴丽贤、李德冠、孟爱民负责实验的设计与实施、论文的审阅；刘冰、李程程负责现场取材及实验。

参 考 文 献

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. *Ca Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69–90. DOI: 10.3322/caac.20107.
- [2] Davidson NE, Armstrong SA, Coussens LM, et al. AACR Cancer Progress Report 2016[J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(Suppl 19): S1–137. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1993.
- [3] Golemis EA, Scheet P, Beck TN, et al. Molecular mechanisms of the preventable causes of cancer in the United States[J]. *Genes Dev*, 2018, 32(13/14): 868–902. DOI: 10.1101/gad.314849.118.
- [4] Arteaga CL, Adamson PC, Engelman JA, et al. AACR Cancer Progress Report 2014[J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(19 Suppl): S1–112. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2123.
- [5] Orth M, Lauber K, Niyazi M, et al. Current concepts in clinical radiation oncology[J]. *Radiat Environ Biophys*, 2014, 53(1): 1–29. DOI: 10.1007/s00411-013-0497-2.
- [6] Wang Y, Liu LB, Pazhanisamy SK, et al. Total body irradiation causes residual bone marrow injury by induction of persistent oxidative stress in murine hematopoietic stem cells[J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, 48(2): 348–356. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.11.005.
- [7] 李德冠, 樊赛军, 孟爱民. 辐射导致长期骨髓抑制的研究进展[J]. *国际放射医学核医学杂志*, 2015, 39(4): 324–327. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2015.04.011.
- Li DG, Fan SJ, Meng AM. Long-term myelosuppression induced by irradiation[J]. *Int J Radiat Med Nucl Med*, 2015, 39(4): 324–327. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2015.04.011.
- [8] Piersma AH, Tonk ECM, Makris SL, et al. Juvenile toxicity testing protocols for chemicals[J]. *Reprod Toxicol*, 2012, 34(3): 482–486. DOI: 10.1016/j.reprotox.2012.04.010.
- [9] Wang Y, Schulte BA, LaRue AC, et al. Total body irradiation selectively induces murine hematopoietic stem cell senescence[J]. *Blood*, 2006, 107(1): 358–366. DOI: 10.1182/blood-2005-04-1418.
- [10] Baker DJ, Alimirah F, van Deursen JM, et al. Oncogenic senescence: a multi-functional perspective[J/OL]. *Oncotarget*, 2017, 8(16): 27661–27672[2018-11-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5432366>. DOI: 10.18632/oncotarget.15742.
- [11] van Deursen JM. The role of senescent cells in ageing[J]. *Nature*, 2014, 509(7501): 439–446. DOI: 10.1038/nature13193.
- [12] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394–424. DOI: 10.3322/caac.21492.
- [13] 于正洪, 王苏莉, 史兆荣, 等. 老年人恶性肿瘤研究进展[J]. *现代肿瘤医学*, 2009, 17(7): 1357–1359. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4992.2009.07.064.
- Yu ZH, Wang SL, Shi ZR, et al. Progress of cancer in the elderly[J]. *J Mod Oncol*, 2009, 17(7): 1357–1359. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4992.2009.07.064.
- [14] 鲍萍萍. 儿童恶性肿瘤的环境危险因素研究进展[J]. *环境与职业医学*, 2008, 25(2): 190–194. DOI: 10.3969/j.issn.1006-3617.2008.02.024.
- Bao PP. Advances in the Research on Environmental Risk Factors of Childhood Cancers[J]. *J Environ Occup Med*, 2008, 25(2): 190–194. DOI: 10.3969/j.issn.1006-3617.2008.02.024.
- [15] Meng AM, Wang Y, van Zant G, et al. Ionizing Radiation and Busulfan Induce Premature Senescence in Murine Bone Marrow Hematopoietic Cells[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(17): 5414–5419.
- [16] 蹇在金. 老年人不宜使用的药物[J]. *中国实用内科杂志*, 2011, 31(1): 17–21.
- Jian ZJ. Inappropriate medication use in older adults[J]. *Chin J Pract Intern Med*, 2011, 31(1): 17–21.
- [17] 路璐, 李德冠, 张俊伶, 等. 不同剂量¹³⁷Cs γ-射线辐射后造血干/祖细胞辐射敏感性差异研究[J]. *天津医药*, 2016, 44(3): 314–317. DOI: 10.11958/20150115.
- Lu L, Li DG, Zhang JL, et al. The difference in the radiosensitivity between hematopoietic stem and progenitor cells after different doses of ¹³⁷Cs γ-radiation[J]. *Tianjin Med J*, 2016, 44(3): 314–317. DOI: 10.11958/20150115.

(收稿日期: 2018-11-01)