

## · 基础研究 ·

# N-草酰基-D-苯丙氨酸对小鼠造血系统辐射损伤的防护作用

唐海康 孟媛媛 孟鑫 龙伟 周晓靓 徐文清

中国医学科学院北京协和医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 300192

通信作者: 徐文清, Email: [xuwenqing@irm-cams.ac.cn](mailto:xuwenqing@irm-cams.ac.cn)

**【摘要】目的** 研究 N-草酰基-D-苯丙氨酸(NOFD)对小鼠造血系统辐射损伤的防护作用。**方法** 将 18 只 6~8 周龄的健康 C57BL/6J 雄性小鼠按区组随机法分为 3 组: 对照组、4 Gy  $\gamma$  射线全身照射组(简称照射组)和 4 Gy  $\gamma$  射线全身照射 + 5 mg/kg NOFD 组(简称照射给药组), 每组 6 只。照射给药组于照射前 2、16 h 及照射后 3 d 分别腹腔给予 5 mg/kg NOFD, 对照组和照射组给予等量生理盐水, 给药时间和次数与照射给药组相同。采用血细胞计数仪分析各组小鼠外周血血细胞数量; 采用流式细胞仪检测外周血中 B 细胞、T 细胞、髓系细胞的百分比, 骨髓细胞中造血干细胞(HSC)和造血祖细胞(HPC)的数量及百分比, 骨髓细胞中磷酸化组蛋白 H2AX( $\gamma$ -H2AX)和线粒体活性氧(ROS)水平; 采用粒细胞-巨噬细胞集落形成单位(CFU-GM)实验和脾集落形成单位(CFU-S)实验检测骨髓细胞的增殖能力。组间两两比较采用 Student *t* 检验。**结果** 与照射组相比, 照射给药组小鼠外周血中红细胞数量明显增加 [(9.05±0.16)×10<sup>9</sup> 个/mL 对 (9.57±0.15)×10<sup>9</sup> 个/mL], T 细胞的百分比升高 [(11.54±0.20)% 对 (15.31±1.88)%], 髓系细胞的百分比降低 [(32.67±2.87)% 对 (24.90±2.19)%], HSC 的数量增加 [(2.24±0.54)×10<sup>3</sup> 个/股骨对 (6.77±1.67)×10<sup>3</sup> 个/股骨], 同时 HSC 和 HPC 在骨髓细胞中的百分比 [(0.09±0.02)% 对 (0.59±0.13)%; (0.62±0.14)% 对 (1.82±0.43)%] 升高, 且差异均有统计学意义 (*t*=1.998~3.633, 均 *P*<0.05)。流式细胞仪检测结果显示, 与照射组相比, 照射给药组小鼠的骨髓有核细胞(BMNC)和 HPC 中线粒体 ROS 自由基(MitoSOX)的平均荧光强度(MFI)明显降低 [(6.66±0.56)×10<sup>3</sup> 对 (3.19±0.25)×10<sup>3</sup>; (2.51±0.46)×10<sup>3</sup> 对 (1.20±0.35)×10<sup>3</sup>], 且差异均有统计学意义 (*t*=6.350、2.282, 均 *P*<0.05); 同时照射给药组小鼠 BMNC、HPC 和 HSC 中  $\gamma$ -H2AX 的 MFI 明显降低 [(10.25±0.77)×10<sup>3</sup> 对 (7.22±0.15)×10<sup>3</sup>; (18.37±2.52)×10<sup>3</sup> 对 (12.44±0.34)×10<sup>3</sup>; (26.05±2.64)×10<sup>3</sup> 对 (17.16±1.20)×10<sup>3</sup>], 且差异均有统计学意义 (*t*=4.356、2.577、3.070, 均 *P*<0.05)。集落形成单位实验结果显示, 与照射组相比, 照射给药组 CFU-GM(12.33±1.48 对 24.00±3.92)和 CFU-S(6.00±1.07 对 10.83±1.01)明显增加, 且差异均有统计学意义 (*t*=2.788、3.288, 均 *P*<0.05)。**结论** NOFD 对小鼠造血系统辐射损伤有明显的保护作用。

**【关键词】** 辐射损伤; 造血系统; 活性氧; 辐射防护剂; N-草酰基-D-苯丙氨酸

**基金项目:** 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(2017-I2M-3-019)

DOI: [10.3760/cma.j.cn121381-202103021-00048](https://doi.org/10.3760/cma.j.cn121381-202103021-00048)

## Protective effects of N-oxalyl-D-phenylalanine on hematopoietic system injury induced by ionizing radiation in mice

Tang Haikang, Meng Yuanyuan, Meng Xin, Long Wei, Zhou Xiaoliang, Xu Wenqing

Tianjin Key Laboratory of Radiation Medicine and Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China

Corresponding author: Xu Wenqing, Email: [xuwenqing@irm-cams.ac.cn](mailto:xuwenqing@irm-cams.ac.cn)

**【Abstract】 Objective** To study the protective effects of N-oxalyl-D-phenylalanine (NOFD) on the radiation injury of hematopoietic system in mice. **Methods** Eighteen healthy C57BL/6J male

mice aged 6–8 weeks were divided into three groups with six mice each according to randomized block design: a control group, a 4 Gy  $\gamma$  ray whole body irradiation group (TBI group), and a 4 Gy  $\gamma$  ray whole body irradiation + 5 mg/kg NOFD group (TBI+NOFD group). The mice in the TBI+NOFD group were intraperitoneally given with 5 mg/kg NOFD at 2, 16 h before irradiation, and 3 d after irradiation, respectively, while the control group and TBI group were intraperitoneally given with the same amount of normal saline at the same time as that in the TBI+NOFD group. The number of peripheral blood cells in each group of mice were analyzed using a blood cell counter. The percentage of B cells, T cells, and myeloid cells in peripheral blood were detected via flow cytometry. The number and percentage of hematopoietic stem cell (HSC) and hematopoietic progenitor cell (HPC) in bone marrow cells were detected via flow cytometry. Levels of phosphorylated histone H2AX ( $\gamma$ -H2AX) and mitochondrial reactive oxygen species in bone marrow cells were detected via flow cytometry. The proliferation ability of bone marrow cells was evaluated by counting colony-forming units-granulocyte-macrophage (CFU-GM) and colony-forming units-spleen(CFU-S). Student's *t* test was used for comparison between two groups. **Results** Compared with that in the TBI group, the number of peripheral blood erythrocytes in the TBI+NOFD group substantially increased ( $(9.05\pm 0.16)\times 10^9/\text{mL}$  vs.  $(9.57\pm 0.15)\times 10^9/\text{mL}$ ). The percentage of T cells increased ( $(11.54\pm 0.20)\%$  vs.  $(15.31\pm 1.88)\%$ ), whereas the percentage of myeloid cells decreased ( $(32.67\pm 2.87)\%$  vs.  $(24.90\pm 2.19)\%$ ). The number of HSC increased ( $(2.24\pm 0.54)\times 10^3/\text{femur}$  vs.  $(6.77\pm 1.67)\times 10^3/\text{femur}$ ), whereas the percentage of HSC and HPC in bone marrow cells significantly increased ( $(0.09\pm 0.02)\%$  vs.  $(0.59\pm 0.13)\%$ ,  $(0.62\pm 0.14)\%$  vs.  $(1.82\pm 0.43)\%$ ;  $t=1.998-3.633$ , all  $P<0.05$ ). The median fluorescence intensity (MFI) of mitochondrial reactive oxygen species (MitoSOX) in bone marrow nucleated cells (BMNC) and HPC in the TBI+NOFD group was significantly lower than that in the TBI group ( $(6.66\pm 0.56)\times 10^3$  vs.  $(3.19\pm 0.25)\times 10^3$ ,  $(2.51\pm 0.46)\times 10^3$  vs.  $(1.20\pm 0.35)\times 10^3$ ;  $t=6.350, 2.282$ , both  $P<0.05$ ). Moreover, the MFI of  $\gamma$ -H2AX in BMNC, HPC, and HSC in the TBI+NOFD group was significantly lower than that in the TBI group ( $(10.25\pm 0.77)\times 10^3$  vs.  $(7.22\pm 0.15)\times 10^3$ ,  $(18.37\pm 2.52)\times 10^3$  vs.  $(12.44\pm 0.34)\times 10^3$ ,  $(26.05\pm 2.64)\times 10^3$  vs.  $(17.16\pm 1.20)\times 10^3$ ;  $t=4.356, 2.577, 3.070$ , all  $P<0.05$ ). Compared with those in the TBI group, CFU-GM ( $12.33\pm 1.48$  vs.  $24.00\pm 3.92$ ) and CFU-S ( $6.00\pm 1.07$  vs.  $10.83\pm 1.01$ ) in the TBI+NOFD group significantly increased ( $t=2.788, 3.288$ ; both  $P<0.05$ ). **Conclusion** NOFD exerts an obvious protective effect on the radiation injury of hematopoietic system in mice.

**【 Key words 】** Radiation injuries; Hematopoietic system; Reactive oxygen species; Radiation-protective agents; N-oxalyl-D-phenylalanine

**Fund program:** Chinese Academy of Medical Sciences Medical and Health Science and Technology Innovation Project (2017-I2M-3-019)

DOI: [10.3760/cma.j.cn121381-202103021-00048](https://doi.org/10.3760/cma.j.cn121381-202103021-00048)

造血系统包括造血细胞、造血微环境(又称为造血干细胞龕)和造血刺激因子,其对电离辐射非常敏感。电离辐射主要破坏或抑制造血细胞的增殖能力,而骨髓抑制是造血系统辐射损伤的主要表现。造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)具有自我更新、增殖和分化生成全血细胞的功能,其受损伤后将引起骨髓持久性抑制,甚至造成个体死亡<sup>[1]</sup>。大量研究结果表明, HSC 储存在造血干细胞龕中<sup>[2]</sup>。哺乳动物 HSC 在骨髓乏氧区骨内膜龕中保持静止状态<sup>[3]</sup>。正常 HSC 能够保持细胞内低氧浓度

并稳定表达低氧诱导因子(hypoxia-inducible factor, HIF)。在缺少 HIF-1 $\alpha$  的小鼠中, HSC 退出细胞循环的静止期,在骨髓移植、骨髓抑制等情况下 HSC 数量明显降低<sup>[4-5]</sup>。提高 HIF-1 $\alpha$  的表达水平,可以提高 HSC 的归巢和移植再生能力<sup>[6-7]</sup>。

HIF 是一种在低氧浓度下被激活的转录因子,由  $\alpha$  亚基和  $\beta$  亚基构成。HIF-1 $\alpha$  的转录活性受环境氧浓度的调节。低氧诱导因子抑制因子(factor inhibiting hypoxia-inducible factor, FIH)又名天冬酰胺酰化酶,是体内调节 HIF-1 $\alpha$  转录活性的主要

因子。在正常氧浓度下, FIH 通过使 HIF-1 $\alpha$  的 C 末端反式激活结构域内第 803 位的天冬氨酸残基羟基化, 阻止 HIF-1 $\alpha$  与转录辅助激活因子 CBP/P300 结合, 从而抑制 HIF-1 $\alpha$  的转录激活; 在低氧浓度下, FIH 的活性降低, 激活 HIF-1 $\alpha$  的转录活性, 启动低氧应激调控网络<sup>[4-6]</sup>。研究表明, 提高 HIF-1 $\alpha$  蛋白的稳定性, 可以缓解辐射引起的造血系统损伤和胃肠功能障碍, 减轻放射性胃肠损伤<sup>[5, 8-9]</sup>。

N-草酰基-D-苯丙氨酸(N-oxalyl-D-phenylalanine, NOFD)是 FIH 的特异性抑制剂<sup>[10]</sup>, 能提高 HIF-1 $\alpha$  的转录活性。我们的前期研究表明, NOFD 能够降低辐射后人结肠癌细胞(HCT116)和仓鼠卵巢细胞(CHO-K1)的细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平, 减轻辐射引起的 DNA 损伤和细胞凋亡; NOFD 能够促进 HCT116 细胞中 HIF-1 $\alpha$  调控的下游基因的表达, 包括促红细胞生成素(EPO)、血红素氧合酶 1(HO-1)、葡萄糖转运蛋白 1(Glut-1)、血管内皮生长因子(VEGF)、Notch2 和 Notch1; 体内实验结果表明, 以 5 mg/kg 的剂量腹腔给予 NOFD, 可以明显提高辐射损伤小鼠的存活率<sup>[11]</sup>。本研究旨在系统评价 NOFD 对小鼠造血系统辐射损伤的防护作用, 以期为 FIH 抑制剂作为新型辐射防护药的研发提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

抗小鼠 Sca-1-PE、CD117(c-kit)APC、CD3-APC 抗体购自美国 eBioscience 公司; Streptavidin-PerCP 抗体, 抗小鼠 CD11b-PerCP、Gr1-PerCP、B220-PE、Ter119 抗体, 抗小鼠 B220、Gr1、CD11b、CD4、CD8、CD11b 抗体均购自美国 Biolegend 公司; 荧光染料 MitoSOX(10  $\mu$ mol/L)购自美国 Life Technologies 公司; FACS™ 裂解溶液、anti- $\gamma$ -H2AX 抗体( $\gamma$ -H2AX 为磷酸化组蛋白 H2AX)购自美国 BD 公司; 乙二胺四乙酸二钾(EDTA)购自美国 Sigma 公司。NOFD 由中国医学科学院北京协和医学院放射医学研究所辐射防护与药物室合成。

Gammacell®40 Exactor <sup>137</sup>Cs  $\gamma$  射线照射源购自加拿大 Best Theratronics 公司, 剂量率为 0.99 Gy/min; MEK-7222K 全自动血液分析仪购自日本光电工业株式会社; Accuri C6 流式细胞仪购自美国 BD 公司。

### 1.2 实验动物、分组及处理方法

18 只 C57BL/6 雄性小鼠, 体重 20~22 g, 6~8 周龄, 由北京维通利华实验动物中心提供[许可证号为 SCXK(京)2016-0011], 饲养在中国医学科学院北京协和医学院放射医学研究所动物中心, 在标准条件[温度(22 $\pm$ 2)℃, 12 h 光明、12 h 黑暗交替, 湿度(50 $\pm$ 10)%]下自由饮用无菌水和进食无特定病原体级鼠繁殖饲料。动物实验开展前获得了中国医学科学院北京协和医学院放射医学研究所动物伦理委员会的批准(批准号: IRM-DWLL-2017109)。所有小鼠饲养 1 周适应环境后, 按照区组随机法分为 3 组: 对照组、4 Gy  $\gamma$  射线全身照射组(简称照射组)和 4 Gy  $\gamma$  射线全身照射+ 5 mg/kg NOFD 组(简称照射给药组), 每组 6 只。照射给药组于照射前 2、16 h 及照射后 3 d 分别腹腔给予 5 mg/kg NOFD, 对照组和照射组给予等量生理盐水, 给药时间和次数与照射给药组相同。

### 1.3 外周血血细胞和骨髓有核细胞(bone marrow nucleated cell, BMNC)的计数

照射后第 9 天脱颈处死小鼠, 采集外周血和双侧股骨。股骨用 PBS 冲洗并收集骨髓细胞, 分别置于事先加入乙二胺四乙酸二钾溶液作抗凝处理的 1.5 mL 离心管中, 经全自动血液分析仪测定并计数小鼠外周血血细胞和 BMNC。

### 1.4 外周血中的 B 细胞、T 细胞和髓系细胞的百分比分析

取 0.5 mL 外周血加入乙二胺四乙酸二钾抗凝剂后, 在室温下用 B220、CD3-APC、Gr1、CD11b 的混合液孵育 30 min。用 FACS™ 裂解溶液除去红细胞。用流式细胞仪检测并计数 B 细胞、T 细胞和髓系细胞, 并应用 Accuri C6 软件对数据进行采集和分析。

### 1.5 造血祖细胞(hematopoietic progenitor cell, HPC)(Lineage<sup>-</sup> Sca1<sup>-</sup> c-kit<sup>+</sup>)和 HSC(Lineage<sup>-</sup> Sca1<sup>+</sup> c-kit<sup>+</sup>)的分析及测定

用 PBS 将小鼠骨髓中的骨髓细胞冲出, 过滤并计数后将 5 $\times$ 10<sup>6</sup> 个骨髓细胞与 CD11b-PerCP、Gr1-PerCP、B220-PE、Ter119、CD4、CD8 抗体的混合液孵育 30 min, 用 PBS 清洗 1 次后弃上清, 加入 Sca-1-PE、CD117(c-kit)APC、Streptavidin-PerCP 与 PBS 的混合液 4  $\mu$ L, 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

(离心半径 35 cm) 5 min 后弃上清, 加入 300  $\mu$ L PBS 重悬细胞, 用流式细胞仪计数 HPC 和 HSC, 并应用美国 BD 公司 Accuri C6 软件对数据进行采集和分析。

### 1.6 骨髓细胞线粒体 ROS 水平的分析

将骨髓细胞与 0.5  $\mu$ mol/L MitoSOX 在 37 $^{\circ}$ C 水浴中孵育 10 min 后, 用流式细胞仪分析各组细胞内线粒体 ROS 自由基(MitoSOX)的平均荧光强度 (median fluorescence intensity, MFI), 并应用 Accuri C6 软件对数据进行采集和分析。

### 1.7 骨髓细胞 DNA 损伤程度的分析

在室温下用 anti- $\gamma$ -H2AX 抗体对骨髓细胞进行染色孵育 1 h, 用流式细胞仪分析各组细胞的  $\gamma$ -H2AX MFI, 并应用 Accuri C6 软件对数据进行采集和分析。

### 1.8 粒细胞-巨噬细胞集落形成单位 (colony-forming units-granulocyte-macrophage, CFU-GM) 实验

分离小鼠骨髓细胞, 取对照组  $1 \times 10^4$  个细胞, 照射组、照射给药组  $5 \times 10^4$  个细胞于 M3534 培养基中培养 5 d 后进行集落形成单位分析, 以细胞数  $\geq 30$  个为阳性集落进行计数。

### 1.9 脾集落形成单位 (colony-forming units-spleen, CFU-S) 实验

照射后第 9 天脱颈处死小鼠并取脾脏, 用 Bouin 液(饱和苦味酸溶液 15 mL、甲醛 5 mL、冰醋酸 1 mL, 混匀即得)固定 24 h 后, 取肉眼可见的集落进行计数。

### 1.10 统计学分析

应用 GraphPad prism 8 软件进行统计学分析。符合正态分布的数据以  $\bar{x} \pm s$  表示; 在方差齐的条件下, 组间两两比较采用 Student *t* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 NOFD 对辐射损伤小鼠外周血各项指标的影响

由图 1 可见, 与对照组相比, 照射组小鼠外周血中 WBC、血小板和 RBC 数量均明显减少, 且差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ ); 与照射组相比, 照射给药组小鼠外周血中血小板 [ $(234.7 \pm 15.81) \times 10^6$  个/mL 对  $(315.5 \pm 32.57) \times 10^6$  个/mL] 和

RBC 数量 [ $(9.05 \pm 0.16) \times 10^9$  个/mL 对  $(9.57 \pm 0.15) \times 10^9$  个/mL] 明显增加, 且差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ ); 与对照组相比, 照射组小鼠淋巴细胞、T 细胞和 B 细胞的百分比均明显下降, 中性粒细胞和髓系细胞的百分比均明显上升, 且差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ ); 与照射组相比, 照射给药组小鼠 T 细胞的百分比 [ $(11.54 \pm 0.20)\%$  对  $(15.31 \pm 1.88)\%$ ] 明显升高, 髓系细胞的百分比 [ $(32.67 \pm 2.87)\%$  对  $(24.90 \pm 2.19)\%$ ] 明显降低, 且差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。以上结果表明, NOFD 改善了小鼠辐射所致的髓系-淋巴系分化失衡, 并使外周血细胞的数量得到部分恢复。

### 2.2 NOFD 对辐射损伤小鼠骨髓细胞的影响

由图 2 可见, 与对照组相比, 照射组小鼠的 BMNC 数量、HPC 数量及百分比、HSC 数量及百分比均明显降低, 且差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ ); 与照射组相比, 照射给药组小鼠的 HSC 数量及百分比 [ $(2.24 \pm 0.54) \times 10^3$  个/股骨对  $(6.77 \pm 1.67) \times 10^3$  个/股骨;  $(0.09 \pm 0.02)\%$  对  $(0.59 \pm 0.13)\%$ ]、HPC 百分比 [ $(0.62 \pm 0.14)\%$  对  $(1.82 \pm 0.43)\%$ ] 均明显升高, 且差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。以上结果表明, NOFD 能够缓解电离辐射对小鼠骨髓中 HSC 和 HPC 的损伤, 提高 HSC 的数量, 使 HSC 和 HPC 在骨髓细胞中的百分比得到恢复, 维持照射后造血系统的平衡。

### 2.3 NOFD 对辐射损伤小鼠骨髓细胞中线粒体 ROS 水平的影响

由图 3 可见, 与对照组相比, 照射组小鼠的 BMNC、HPC 中线粒体 ROS 自由基(MitoSOX)的 MFI 明显升高, 且差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ ); 与照射组相比, 照射给药组小鼠的 BMNC 和 HPC 中线粒体 ROS 自由基(MitoSOX)的 MFI 明显降低 [ $(6.66 \pm 0.56) \times 10^3$  对  $(3.19 \pm 0.25) \times 10^3$ ;  $(2.51 \pm 0.46) \times 10^3$  对  $(1.20 \pm 0.35) \times 10^3$ ], 且差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。以上结果表明, NOFD 能清除骨髓细胞中线粒体的 ROS, 减轻辐射所致的损伤。

### 2.4 NOFD 对辐射损伤小鼠骨髓细胞中 DNA 损伤的影响

由图 4 可见, 与对照组相比, 照射组小鼠的 BMNC、HPC 和 HSC 中  $\gamma$ -H2AX 的 MFI 明显增加, 且差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ ), 这表明 4 Gy

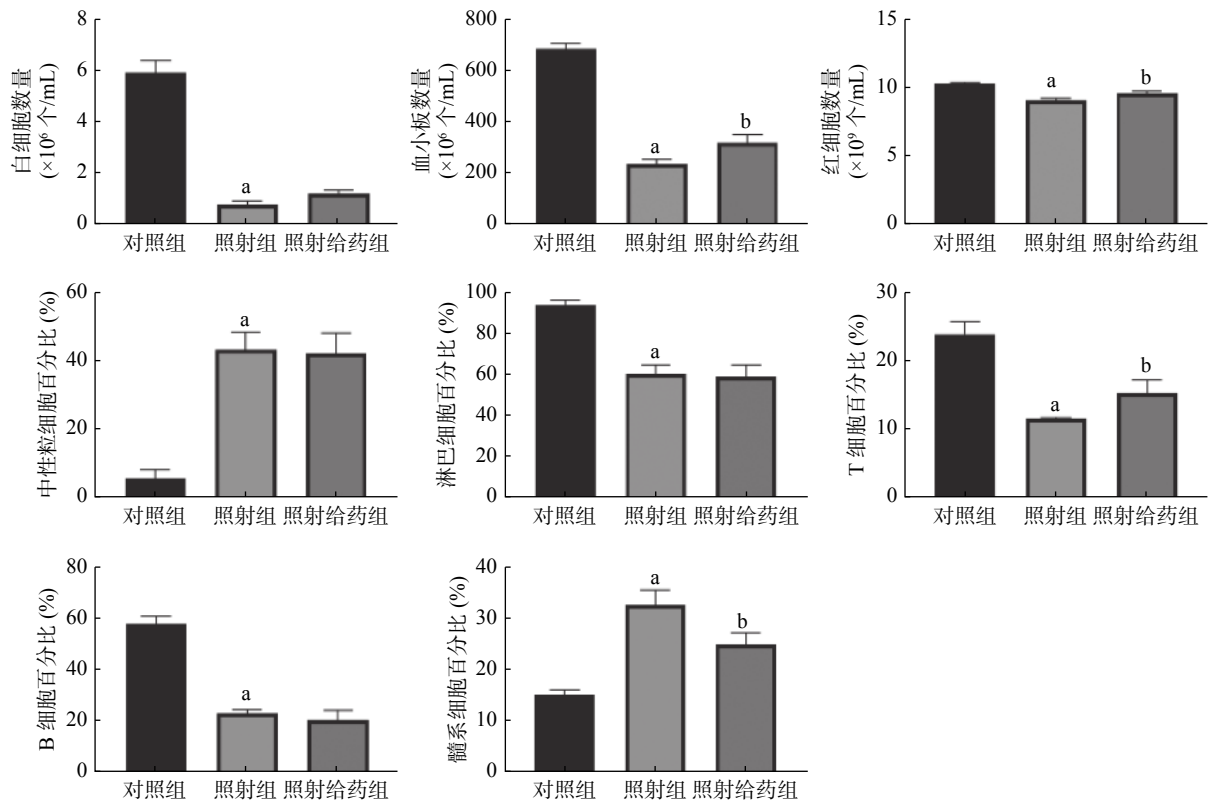


图1 N-草酰基-D-苯丙氨酸对辐射损伤小鼠外周血指标的影响<sup>a</sup>表示与对照组比较,差异均有统计学意义( $t=5.350\sim 16.870$ ,均 $P<0.05$ );<sup>b</sup>表示与照射组比较,差异均有统计学意义( $t=1.998\sim 2.411$ ,均 $P<0.05$ )。对照组为未照射且不给药;照射组为4 Gy  $\gamma$ 射线全身照射;照射给药组为4 Gy  $\gamma$ 射线全身照射+5 mg/kg N-草酰基-D-苯丙氨酸

Figure 1 Effects of N-oxalyl-D-phenylalanine on peripheral blood indexes of irradiated mice

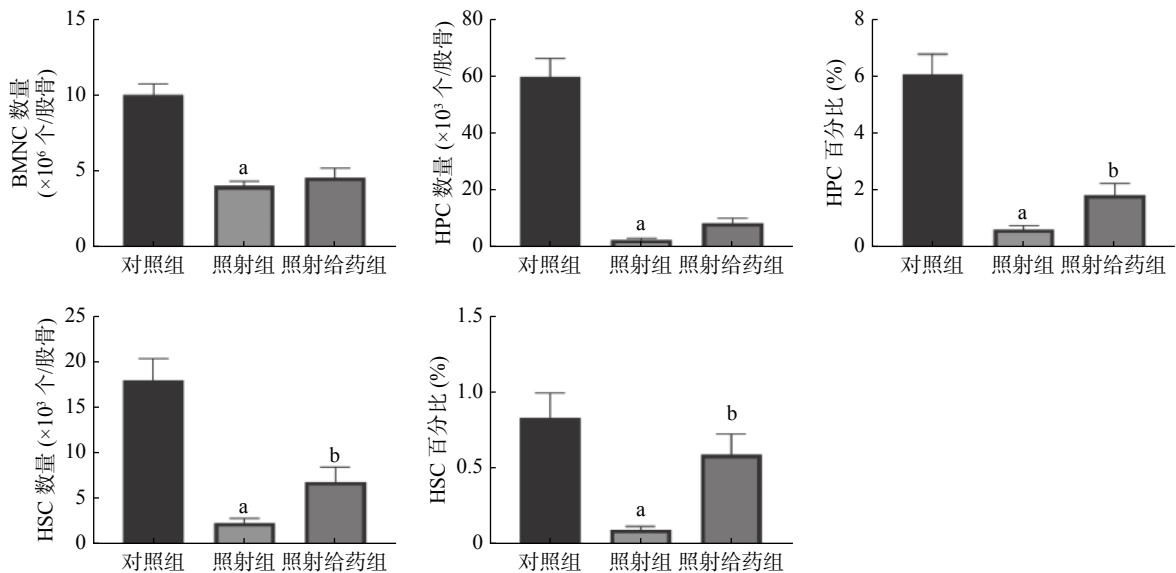
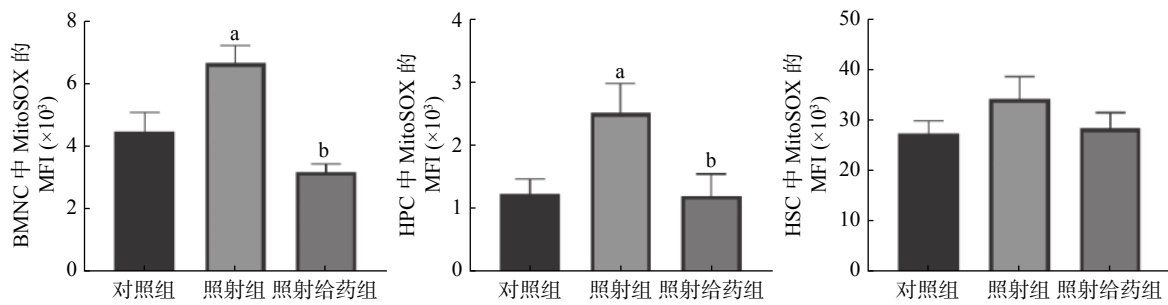


图2 N-草酰基-D-苯丙氨酸对辐射损伤小鼠骨髓细胞的影响<sup>a</sup>表示与对照组比较,差异均有统计学意义( $t=4.503\sim 8.770$ ,均 $P<0.05$ );<sup>b</sup>表示与照射组比较,差异均有统计学意义( $t=2.683, 2.581, 3.633$ ,均 $P<0.05$ )。对照组为未照射且不给药;照射组为4 Gy  $\gamma$ 射线全身照射;照射给药组为4 Gy  $\gamma$ 射线全身照射+5 mg/kg N-草酰基-D-苯丙氨酸。BMNC为骨髓有核细胞;HSC为造血干细胞;HPC为造血祖细胞

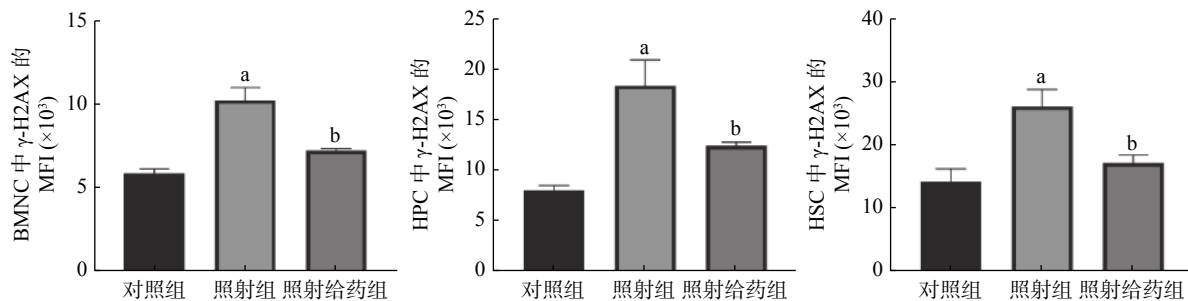
Figure 2 Effects of N-oxalyl-D-phenylalanine on bone marrow cells in irradiated mice

的电离辐射对小鼠骨髓细胞 DNA 的损伤较为严重;与照射组相比,照射给药组小鼠的 BMNC、HPC 和 HSC 中  $\gamma$ -H2AX 的 MFI 明显降低 [(10.25±0.77)×10<sup>3</sup> 对 (7.22±0.15)×10<sup>3</sup>; (18.37±2.52)×10<sup>3</sup> 对



**图3** N-草酰基-D-苯丙氨酸对辐射损伤小鼠骨髓细胞中线粒体活性氧水平的影响<sup>a</sup>表示与对照组比较,差异均有统计学意义( $t=2.538, 2.331$ , 均 $P<0.05$ );<sup>b</sup>表示与照射组比较,差异均有统计学意义( $t=6.350, 2.282$ , 均 $P<0.05$ )。对照组为未照射且不给药;照射组为4 Gy  $\gamma$ 射线全身照射;照射给药组为4 Gy  $\gamma$ 射线全身照射+5 mg/kg N-草酰基-D-苯丙氨酸。BMNC为骨髓有核细胞;MitoSOX为一种荧光染料;MFI为平均荧光强度;HPC为造血祖细胞;HSC为造血干细胞

**Figure 3** Effects of N-oxalyl-D-phenylalanine on the level of mitochondrial reactive oxygen species in bone marrow cells of irradiated mice



**图4** N-草酰基-D-苯丙氨酸对辐射损伤小鼠骨髓细胞DNA损伤的影响<sup>a</sup>表示与对照组比较,差异均有统计学意义( $t=5.964, 4.029, 3.465$ , 均 $P<0.05$ );<sup>b</sup>表示与照射组比较,差异均有统计学意义( $t=4.356, 2.577, 3.070$ , 均 $P<0.05$ )。对照组为未照射且不给药;照射组为4 Gy  $\gamma$ 射线全身照射;照射给药组为4 Gy  $\gamma$ 射线全身照射+5 mg/kg N-草酰基-D-苯丙氨酸。BMNC为骨髓有核细胞; $\gamma$ -H2AX为磷酸化组蛋白H2AX;MFI:平均荧光强度;HPC为造血祖细胞;HSC为造血干细胞

**Figure 4** Effects of N-oxalyl-D-phenylalanine on DNA damage of bone marrow cells in irradiated mice

( $12.44 \pm 0.34$ )  $\times 10^3$ ; ( $26.05 \pm 2.64$ )  $\times 10^3$  对 ( $17.16 \pm 1.20$ )  $\times 10^3$ ], 且差异均有统计学意义(均 $P<0.05$ )。以上结果表明, NOFD 可以减轻辐射损伤小鼠骨髓细胞中DNA的双链断裂。

### 2.5 NOFD对辐射损伤小鼠骨髓细胞增殖能力的影响

由图5可见,与对照组相比,照射组小鼠的骨髓细胞的CFU-GM明显减少,且差异有统计学意义( $P<0.05$ ),这表明4 Gy照射能明显降低骨髓细胞的增殖能力;与照射组相比,照射给药组小鼠骨髓细胞的CFU-GM明显增多( $12.33 \pm 1.48$ 对 $24.00 \pm 3.92$ ),且差异有统计学意义( $P<0.05$ )。与对照组相比,照射组小鼠的骨髓细胞的CFU-S增加,且差异有统计学意义( $P<0.05$ );与照射组相比,照射给药组小鼠CFU-S明显增加( $6.00 \pm 1.07$ 对 $10.83 \pm 1.01$ ),且差异有统计学意义( $P<0.05$ )。以上结果表明,NOFD可增强辐射损伤小鼠骨髓细胞的增殖能力。

## 3 讨论

随着我国核能应用的不断发展,放射性同位素和射线检测技术的广泛应用,以及核恐怖威胁的持续存在,人们暴露在辐射下的风险不断升高。中高剂量照射引起的骨髓抑制成为辐射致死的主要原因。在肿瘤的临床治疗中,放疗的不良反应之一即为引起骨髓抑制,进而影响患者的治疗效果和生活质量。因此,临床上迫切需要使用辐射防护剂,特别是辐射损伤后的治疗药物,以提高患者辐射损伤的治疗效果,满足辐射损伤人群救治的需要。

HIF是由Semenza<sup>[12]</sup>发现的一类氧敏感性异二聚体蛋白,其对机体在低氧浓度下发生的一系列生理学改变起着关键性的调控作用。研究结果显示,在组织贫(缺)血和炎症疾病中,HIF蛋白的稳定表达对缓解病情具有重要作用<sup>[13]</sup>。对辐射损伤的研究结果显示,通过稳定HIF-1 $\alpha$ 可以改善辐射造成的造血系统损伤<sup>[2]</sup>和胃肠功能障碍<sup>[8]</sup>。

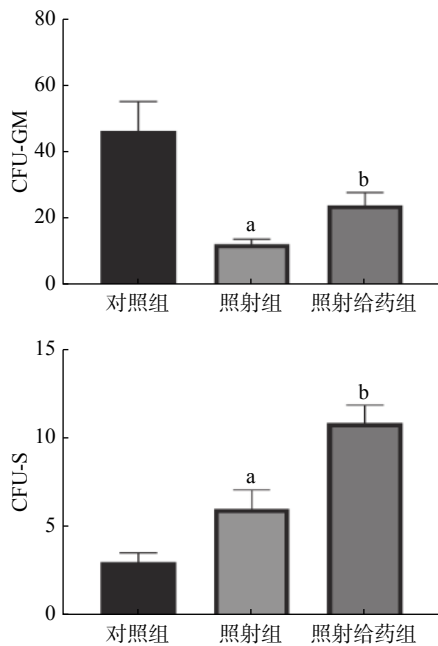


图 5 N-草酰基-D-苯丙氨酸对辐射损伤小鼠骨髓细胞的 CFU-GM 和 CFU-S 的影响 <sup>a</sup> 表示与对照组比较, 差异均有统计学意义( $t=4.193, 2.350$ , 均  $P<0.05$ ); <sup>b</sup> 表示与照射组比较, 差异均有统计学意义( $t=2.788, 3.288$ , 均  $P<0.05$ )。对照组为未照射且不给药; 照射组为 4 Gy  $\gamma$  射线全身照射; 照射给药组为 4 Gy  $\gamma$  射线全身照射+ 5 mg/kg N-草酰基-D-苯丙氨酸。CFU-GM 为粒细胞-巨噬细胞集落形成单位; CFU-S 为脾集落形成单位

Figure 5 Effects of N-oxalyl-D-phenylalanine on colony-forming units-granulocyte-macrophage and colony-forming units-spleen in irradiated mice

研究结果显示, 电离辐射可导致造血系统损伤<sup>[14-15]</sup>, HSC 和 HPC 的再生和分化能力受到影响, 引起造血细胞数量减少及其在骨髓细胞中的百分比降低, 导致外周血中髓系-淋巴系分化的失衡<sup>[16]</sup>, 表现为外周血细胞及淋巴细胞减少, 髓系细胞增多。电离辐射还能够直接导致 DNA 损伤或介导 ROS 间接损伤 DNA,  $\gamma$ -H2AX 是评估 DNA 双链断裂损伤的一种重要标志物。细胞在受到照射后, ROS 水平会显著升高<sup>[17]</sup>。受到辐射损伤的线粒体的通透性会发生改变, 并将这一损伤通过  $Ca^{2+}$  传递给邻近的线粒体, 导致线粒体内 ROS 水平升高<sup>[18]</sup>, 因此, 线粒体内 ROS 自由基的清除能力是评价辐射防护效果的重要指标。

在本研究中, 我们探讨了调控 HIF-1 $\alpha$  转录活性的 FIH 抑制剂 NOFD 在小鼠辐射损伤中的作用, 评价其对辐射诱导的造血系统损伤的防护效果。结果显示, NOFD 能缓解辐射损伤小鼠的骨髓抑制, 保护 HSC 和 HPC, 刺激 HSC 增殖, 通过降

低骨髓细胞线粒体中 ROS 水平来减轻 DNA 损伤。

然而, 目前关于 NOFD 的生物活性及作用机制的研究报道并不多见。我们的研究团队首次发现了 NOFD 具有较好的辐射防护作用, 其作用机制可能与其促进 HIF-1 $\alpha$  的转录活性和 HIF 下游基因, 如促红细胞生成素(EPO)、血管内皮生长因子(VEGF)等的表达有关<sup>[19]</sup>。因为重组促红细胞生成素(EPO)被报道具有明显的辐射防护作用<sup>[20-22]</sup>, 而血管内皮生长因子(VEGF)可以促进缺氧环境下的血管生成<sup>[23]</sup>。

FIH 在蛋白-蛋白相互作用过程中能识别多个蛋白底物, FIH 除了调控 HIF-1 通路转录活性外, FIH 蛋白底物还可富集至核因子  $\kappa$ B、Notch 等信号通路中。FIH 对 Notch 有很高的亲和力, 可以羟化 Notch 的天冬酰胺残基, 影响 Notch 途径的下游靶基因。HIF-1 $\alpha$  和 Notch 信号通路在 FIH 处相互联系, 敲除 FIH 可激活 Notch 信号通路。Notch 作为一条高度保守的信号通路, 在细胞增殖、分化和凋亡过程中发挥着重要作用<sup>[24]</sup>。研究结果表明, Notch 受体和配体在哺乳动物造血系统中广泛表达<sup>[25]</sup>。其中, Notch1 和 Notch2 在 HSC 中高表达, Notch 配体在造血微环境中高表达。Notch 信号通路能够促进 HSC 的“干性”维持, 其靶基因发状分裂相关增强子在 HSC 中高表达<sup>[26]</sup>。在造血微环境中高表达的 Notch 配体与 HSC 上的 Notch 受体直接接触, 激活 Notch 信号通路, 平衡 HSC 的自我更新和分化, 避免 HSC 耗竭, 促进造血重建<sup>[27]</sup>。我们之前的研究结果也证实了 NOFD 能够显著促进 Notch mRNA 的表达<sup>[11]</sup>。因此, NOFD 发挥辐射防护作用的机制可能与其抑制 FIH 激活 Notch 信号通路有关。

近些年, HIF-1 $\alpha$  与 HSC 的辐射损伤、修复之间的关系逐渐引起了研究者的广泛兴趣。研究结果表明, 辐射可以导致机体内产生大量 ROS, 异常增多的 ROS 可抑制 HSC 的自我更新, 诱导 HSC 衰老, 同时又可影响 HIF-1 $\alpha$  的转录活性<sup>[28-29]</sup>; 而上调 HIF-1 $\alpha$  可以降低细胞中的 ROS 水平<sup>[30]</sup>。由此可见, ROS 与 HIF-1 $\alpha$  之间可以相互影响。清除照射产生的 ROS 一直是辐射损伤防护的重要策略。本研究结果表明, NOFD 能够降低 BMNC 和 HPC 中线粒体 ROS 水平, 减轻 HSC 的 DNA 损伤, 增强 HSC 的增殖能力, 调节髓系-淋巴系分化失衡。

综上,本研究结果证实,NOFD促进了辐射损伤小鼠造血系统的恢复,改善了细胞内的氧化应激,发挥了辐射防护作用。然而,关于NOFD的作用机制仍有待深入地研究。

**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** 唐海康负责数据的统计、图表的制作、论文的撰写与修改;孟媛媛、孟鑫负责现场的实验;龙伟、周晓靓负责数据的统计与分析;徐文清负责论文的审阅与修改。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Shao LJ, Luo Y, Zhou DH. Hematopoietic stem cell injury induced by ionizing radiation[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20(9): 1447–1462. DOI: [10.1089/ars.2013.5635](https://doi.org/10.1089/ars.2013.5635).
- [ 2 ] Forristal CE, Winkler IG, Nowlan B, et al. Pharmacologic stabilization of HIF-1 $\alpha$  increases hematopoietic stem cell quiescence in vivo and accelerates blood recovery after severe irradiation[J]. *Blood*, 2013, 121(5): 759–769. DOI: [10.1182/blood-2012-02-408419](https://doi.org/10.1182/blood-2012-02-408419).
- [ 3 ] Morikawa T, Takubo K. Hypoxia regulates the hematopoietic stem cell niche[J]. *Pflugers Arch*, 2016, 468(1): 13–22. DOI: [10.1007/s00424-015-1743-z](https://doi.org/10.1007/s00424-015-1743-z).
- [ 4 ] Takubo K, Goda N, Yamada W, et al. Regulation of the HIF-1 $\alpha$  level is essential for hematopoietic stem cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2010, 7(3): 391–402. DOI: [10.1016/j.stem.2010.06.020](https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.06.020).
- [ 5 ] Vukovic M, Sepulveda C, Subramani C, et al. Adult hematopoietic stem cells lacking Hif-1 $\alpha$  self-renew normally[J]. *Blood*, 2016, 127(23): 2841–2846. DOI: [10.1182/blood-2015-10-677138](https://doi.org/10.1182/blood-2015-10-677138).
- [ 6 ] Speth JM, Hoggatt J, Singh P, et al. Pharmacologic increase in HIF1 $\alpha$  enhances hematopoietic stem and progenitor homing and engraftment[J]. *Blood*, 2014, 123(2): 203–207. DOI: [10.1182/blood-2013-07-516336](https://doi.org/10.1182/blood-2013-07-516336).
- [ 7 ] Ratajczak MZ, Suszysnska M. Emerging strategies to enhance homing and engraftment of hematopoietic stem cells[J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2016, 12(1): 121–128. DOI: [10.1007/s12015-015-9625-5](https://doi.org/10.1007/s12015-015-9625-5).
- [ 8 ] Taniguchi CM, Miao YR, Diep AN, et al. PHD inhibition mitigates and protects against radiation-induced gastrointestinal toxicity via HIF2[J]. *Sci Transl Med*, 2014, 6(236): 236ra64. DOI: [10.1126/scitranslmed.3008523](https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008523).
- [ 9 ] Zhang P, Du JC, Zhao HN, et al. Radioprotective effects of roxadustat (FG-4592) in haematopoietic system[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(1): 349–356. DOI: [10.1111/jcmm.13937](https://doi.org/10.1111/jcmm.13937).
- [ 10 ] McDonough MA, McNeill LA, Tilliet M, et al. Selective inhibition of factor inhibiting hypoxia-inducible factor[J]. *J Am Chem Soc*, 2005, 127(21): 7680–7681. DOI: [10.1021/ja050841b](https://doi.org/10.1021/ja050841b).
- [ 11 ] 孟媛媛,徐文清. N-草酰化-D-苯丙氨酸对小鼠的辐射防护作用[J]. *辐射研究与辐射工艺学报*, 2019, 37(3): 030302. DOI: [10.11889/j.1000-3436.2019.rj.37.030302](https://doi.org/10.11889/j.1000-3436.2019.rj.37.030302).  
Meng YY, Xu WQ. Protective effect of N-oxalyl-D-phenylalanine on radiation injury in mice[J]. *J Radiat Res Radiat Process*, 2019, 37(3): 030302. DOI: [10.11889/j.1000-3436.2019.rj.37.030302](https://doi.org/10.11889/j.1000-3436.2019.rj.37.030302).
- [ 12 ] Semenza GL. Involvement of hypoxia-inducible factor 1 in human cancer[J]. *Intern Med*, 2002, 41(2): 79–83. DOI: [10.2169/internalmedicine.41.79](https://doi.org/10.2169/internalmedicine.41.79).
- [ 13 ] Chan MC, Holt-Martyn JP, Schofield CJ, et al. Pharmacological targeting of the HIF hydroxylases — a new field in medicine development[J]. *Mol Aspects Med*, 2016, 47/48: 54–75. DOI: [10.1016/j.mam.2016.01.001](https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.01.001).
- [ 14 ] Xue XL, Han XD, Li Y, et al. Astaxanthin attenuates total body irradiation-induced hematopoietic system injury in mice via inhibition of oxidative stress and apoptosis[J/OL]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8(1): 7[2021-03-22]. DOI: [10.1186/s13287-016-0464-3](https://doi.org/10.1186/s13287-016-0464-3).
- [ 15 ] Han XD, Xue XL, Zhao Y, et al. Rutin-enriched extract from *Coriandrum sativum* L. ameliorates ionizing radiation-induced hematopoietic injury[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(5): 942 [2021-03-22]. <https://www.mdpi.com/1422-0067/18/5/942>. DOI: [10.3390/ijms18050942](https://doi.org/10.3390/ijms18050942).
- [ 16 ] Wang JW, Sun Q, Morita Y, et al. A differentiation checkpoint limits hematopoietic stem cell self-renewal in response to DNA damage[J]. *Cell*, 2012, 148(5): 1001–1014. DOI: [10.1016/j.cell.2012.01.040](https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.040).
- [ 17 ] Scialò F, Fernández-Ayala DJ, Sanz A. Role of mitochondrial reverse electron transport in ROS signaling: potential roles in health and disease[J/OL]. *Front Physiol*, 2017, 8: 428[2021-03-22]. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2017.00428/full>. DOI: [10.3389/fphys.2017.00428](https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00428).
- [ 18 ] Sanz A, Pamplona R, Barja G. Is the mitochondrial free radical theory of aging intact?[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2006, 8(3/4): 582–599. DOI: [10.1089/ars.2006.8.582](https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.582).
- [ 19 ] Meng YY, Yang FJ, Long W, et al. Radioprotective activity and preliminary mechanisms of N-oxalyl-D-phenylalanine (NOFD) in vitro[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(1): 37[2021-03-22]. <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/1/37>. DOI: [10.3390/ijms20010037](https://doi.org/10.3390/ijms20010037).
- [ 20 ] Peslak SA, Wenger J, Bemis JC, et al. EPO-mediated expansion of late-stage erythroid progenitors in the bone marrow initiates recovery from sublethal radiation stress[J]. *Blood*, 2012, 120(12): 2501–2511. DOI: [10.1182/blood-2011-11-394304](https://doi.org/10.1182/blood-2011-11-394304).
- [ 21 ] Galal SM, Abdel-Rafei MK, Hasan HF. Cholinergic and cytoprotective signaling cascades mediate the mitigative effect of erythropoietin on acute radiation syndrome[J]. *Can J Physiol*



- Pharmacol, 2018, 96(5): 442–458. DOI: [10.1139/cjpp-2017-0578](https://doi.org/10.1139/cjpp-2017-0578).
- [22] Ugurluer G, Cebi A, Mert H, et al. Neuroprotective effects of erythropoietin against oxidant injury following brain irradiation: an experimental study[J]. *Arch Med Sci*, 2016, 12(6): 1348–1353. DOI: [10.5114/aoms.2016.58622](https://doi.org/10.5114/aoms.2016.58622).
- [23] Chen Q, Liu Y, Jeong HW, et al. Apelin<sup>+</sup> endothelial niche cells control hematopoiesis and mediate vascular regeneration after myeloablative injury[J]. *Cell Stem Cell*, 2019, 25(6): 768–783. DOI: [10.1016/j.stem.2019.10.006](https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.10.006).
- [24] Kiriakidis S, Henze AT, Kruszynska-Ziaja I, et al. Factor-inhibiting HIF-1 (FIH-1) is required for human vascular endothelial cell survival[J]. *FASEB J*, 2015, 29(7): 2814–2827. DOI: [10.1096/fj.14-252379](https://doi.org/10.1096/fj.14-252379).
- [25] Kim A, Shim S, Kim MJ, et al. Mesenchymal stem cell-mediated Notch2 activation overcomes radiation-induced injury of the hematopoietic system[J/OL]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 9277[2021-03-22]. DOI: [10.1038/s41598-018-27666-w](https://doi.org/10.1038/s41598-018-27666-w).
- [26] Denking MD, Leins H, Schirmbeck R, et al. HSC aging and senescent immune remodeling[J]. *Trends Immunol*, 2015, 36(12): 815–824. DOI: [10.1016/j.it.2015.10.008](https://doi.org/10.1016/j.it.2015.10.008).
- [27] Janghorban M, Xin L, Rosen JM, et al. Notch signaling as a regulator of the tumor immune response: to target or not to target?[J/OL]. *Front Immunol*, 2018, 9: 1649[2021-03-22]. DOI: [10.3389/fimmu.2018.01649](https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01649).
- [28] Semenza GL. Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1[J]. *Physiology (Bethesda)*, 2009, 24: 97–106. DOI: [10.1152/physiol.00045.2008](https://doi.org/10.1152/physiol.00045.2008).
- [29] Gerić M, Gajski G, Garaj-Vrhovac V.  $\gamma$ -H2AX as a biomarker for DNA double-strand breaks in ecotoxicology[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2014, 105: 13–21. DOI: [10.1016/j.ecoenv.2014.03.035](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.03.035).
- [30] Chen CX, Hao XH, Geng ZR, et al. ITRAQ-based quantitative proteomic analysis of MG63 in response to HIF-1 $\alpha$  inducers[J]. *J Proteomics*, 2020, 211: 103558. DOI: [10.1016/j.jprot.2019.103558](https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103558).

(收稿日期: 2021-03-23)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 2021 年本刊可直接使用缩写形式的常用词汇

**ATP**(adenosine-triphosphate), 三磷酸腺苷  
**AUC**(area under curve), 曲线下面积  
**CI**(confidence interval), 可信区间  
**CT**(computed tomography), 计算机断层摄影术  
**CV**(coefficient of variation), 变异系数  
**DNA**(deoxyribonucleic acid), 脱氧核糖核酸  
**DTC**(differentiated thyroid cancer), 分化型甲状腺癌  
**DTPA**(diethylene-triaminepentaacetic acid), 二亚乙基三胺五乙酸  
**FDG**(fluorodeoxyglucose), 氟脱氧葡萄糖  
**MDP**(methylenediphosphonate), 亚甲基二膦酸盐  
**MIBI**(methoxyisobutylisonitrile), 甲氧基异丁基异腈  
**MRI**(magnetic resonance imaging), 磁共振成像  
**MTT**(3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide), 3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴盐  
**PBS**(phosphate-buffered solution), 磷酸盐缓冲液  
**PCR**(polymerase chain reaction), 聚合酶链反应  
**PET**(positron emission tomography), 正电子发射断层显像术  
**RBC**(red blood cell), 红细胞

**RNA**(ribonucleic acid), 核糖核酸  
**ROC**(receiver operator characteristic), 受试者工作特征  
**ROI**(region of interest), 感兴趣区  
**SER**(sensitization enhancement ratio), 放射增敏比  
**SPECT**(single photon emission computed tomography), 单光子发射计算机断层摄影术  
**SUV**(standardized uptake value), 标准化摄取值  
**SUV<sub>max</sub>**(maximum standardized uptake value), 最大标准化摄取值  
**SUV<sub>min</sub>**(minimum standardized uptake value), 最小标准化摄取值  
**T<sub>3</sub>**(triiodothyronine), 三碘甲腺原氨酸  
**T<sub>4</sub>**(thyroxine), 甲状腺素  
**TNF**(tumor necrosis factor), 肿瘤坏死因子  
**TNM**(tumor, node, metastasis), 肿瘤、淋巴结、转移  
**T/NT**(the ratio of target to non-target), 靶/非靶比值  
**TSH**(thyroid-stimulating hormone), 促甲状腺激素  
**WBC**(white blood cell count), 白细胞计数