

胎肌条件培养液对急性辐照小鼠 造血损伤的防护和促恢复作用研究

魏虎来 赵怀顺 马兰芳

(兰州医学院血液病研究所, 兰州 730000)

摘要 观察了人胎肌条件培养液(FMCM)对6.5 Gy ^{60}Co 亚致死量照射小鼠造血损伤的保护和促恢复作用。结果证明:照射前小鼠腹腔注射 FMCM 2.5~5.0 ml/kg·d × 5 d, 能有效地预防和延缓因辐射所致的造血干细胞(CFU-S)和外周血细胞的降低;照射后给予同样剂量的 FMCM, 对辐射所致的小鼠外周血细胞的减低有明显的促恢复作用, 能显著促进辐射损伤小鼠的髓外造血重建。表明 FMCM 对照射造成的造血损伤具有良好的保护和治疗作用。

关键词 电离辐射, 造血损伤, 胎肌条件培养液(FMCM), 辐射防护

随着辐射与防护医学的发展,造血细胞研究技术已越来越多地应用于研究辐射对机体造血系统的损伤、重建过程及辐射防护物质^[1]。已证实白介素、造血细胞刺激因子等具有防治辐射损伤的作用^[2]。但目前临床上应用的造血细胞刺激因子均为基因工程重组产品,因其价格昂贵而限制了其推广应用。葛忠良等^[3]首先应用小鼠与人胎肌条件培养液(fetal muscle conditioned medium, FMCM)作为细胞集落刺激因子(Colony stimulating factor, CSF)的来源,分别用于体外正常及病理状态下的小鼠与人造血祖细胞的培养,证实小鼠与人 FMCM 中均含丰富的 CSF 活性^[4],并对小鼠肌浸液中的 CSF 进行了初步分离和活性测定^[5]。本文观察了人 FMCM 对急性亚致死量 γ 射线照射小鼠造血损伤的防护和促恢复作用。

1 材料与 方法

1.1 人胎肌条件培养液(FMCM)的制备^[4]

取正常水囊引产胎儿的肌肉,剪碎,漂洗,浸泡,按10%(W/V)浸泡在含20%人AB血浆、2 mmol/L L-谷氨酰胺、100 u/ml 青霉素、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素的 RPMI 1640(Gibco)培养液中,置5%CO₂ 培养箱中,37℃孵育10 d,收集上清液,超滤,分装,冻干,即为 FMCM,使用时用等量注射用水溶解。

1.2 FMCM 中 CSF 活性测定^[5]

应用正常人骨髓粒-单祖细胞(GM-CFU)琼脂培养法,以 FMCM 支持骨髓细胞产生的集落(CFU)数表示其 CSF 活性。

1.3 动物模型

纯系 Balb/C 小鼠(卫生部兰州生物制品研究所),体重 22 ± 2 g,雌雄兼用,随机分组,根据设计,给药前后分别用 ^{60}Co γ 射线一次性全身照射,剂量为 6.5 Gy。

收稿日期:初稿 1995-05-29, 修改稿 1995-08-15

1.4 动物处理

动物随机分组: A. 防护对照组: 照射前腹腔注射对应量的血浆和培养液滤液; B. 治疗对照组: 照射后腹腔注射上述滤液; C. 防护组: 照射前5 d按2.5~5.0 ml/kg·d腹腔注射FMCM,共5 d; D. 治疗组: 照射当日开始注射FMCM,量同C组。

1.5 内源性脾结节(CFU-S)测定^[6]

小鼠亚致死量全身照射后第11 d处死,取脾脏称湿重,在Bouin's液中固定,计数脾脏表面结节数,一个结节代表一个CFU-S。

1.6 外周血红细胞、白细胞和血红蛋白测定

全部小鼠照射后第8 d尾尖采血,半自动血细胞计数仪(瑞士)上计数红细胞(RBC)、白细胞(WBC)总数和血红蛋白(Hb)含量。

2 结 果

2.1 FMCM 中 CSF 活性

经体外GM-CFU培养法测定,10%FMCM活性最高,0.1 ml FMCM/1 ml体系可支持 2×10^5 个人骨髓细胞产生 107.50 ± 13.04 个细胞集落,其中致密型61.2%,疏散型18.8%,混合型20.0%;制片染色观察:混合型集落中含粒细胞和单核细胞,疏散型集落中绝大多数细胞为单核、巨噬细胞,而致密型集落中95%以上则为粒细胞,周边可见少数单核、巨噬细胞。因此认为FMCM中CSF活性以GM-CSF为主,并可能含有少量G-CSF和M-CSF。

2.2 FMCM 对照射小鼠造血损伤的保护效应

照射前给予FMCM,存活小鼠内源性CFU-S明显高于对照组($p < 0.05 \sim 0.01$),在剂量为2.5 ml/kg和5.0 ml/kg时分别为对照组的145%和162%;5.0 ml/kg剂量时脾脏湿重也明显增加($p < 0.01$)(表1)。

Tab 1. Hemopoietic protection of FMCM in irradiated mice ($\bar{x} \pm s$)

Group	Spleen wight/g	CFU-S/spleen
Control	0.70 ± 0.10	15.67 ± 3.94
Prevention/2.5 ml kg ⁻¹ d ⁻¹ × 5 d	0.75 ± 0.10	$22.67 \pm 4.46^{(1)}$
Prevention/5.0 ml kg ⁻¹ d ⁻¹ × 5 d	$0.83 \pm 0.03^{(2)}$	$25.33 \pm 4.78^{(2)}$

n = 6 (1) $p < 0.05$ (2) $p < 0.01$

2.3 FMCM 对照射小鼠造血损伤的促恢复作用

小鼠照射后每天给予2.5 ml和5.0 ml/kg FMCM,CFU-S数明显增高,分别为对照组的141%和200%;剂量为5.0 ml/kg时脾重亦高于对照组($p < 0.05$)(表2)。

Tab 2. Enhancement of hematopoietic recovery of FMCM in irradiated mice ($\bar{x} \pm s$)

Group	Spleen wight/g	CFU-S/spleen
Control	0.72 ± 0.09	18.00 ± 3.59
Treatment/2.5 ml kg ⁻¹ d ⁻¹ × 5 d	0.78 ± 0.07	$25.29 \pm 4.86^{(2)}$
Treatment/5.0 ml kg ⁻¹ d ⁻¹ × 5 d	$0.81 \pm 0.06^{(1)}$	$36.00 \pm 6.19^{(2)}$

n = 7 (1) $p < 0.05$ (2) $p < 0.01$

2.4 FMCM 对照射小鼠外周血细胞降低的预防和促恢复作用

小鼠在照射前给予 FMCM(5.0 ml/kg·d × 5 d)可有效地预防和延缓外周血 RBC、WBC 和 Hb 含量的下降 ($p < 0.05 \sim 0.01$); 照射后给予则促进血细胞的恢复。($p < 0.05 \sim 0.01$)(表 3)。

Tab 3. Effects of FMCM on RBC, WBC and Hb of peripheral blood in irradiated mice ($\bar{x} \pm s$)

Group	RBC/ $10^{12}L^{-1}$	WBC/ 10^9L^{-1}	Hb/g·L ⁻¹
Normal	10.08 ± 0.94	9.82 ± 2.04	172.80 ± 12.66
Irradiation control	5.81 ± 0.93	3.16 ± 1.25	109.40 ± 19.83
Prevention/5.0 ml kg ⁻¹ d ⁻¹ × 5 d	7.54 ± 1.05 ⁽²⁾	7.79 ± 1.20 ⁽²⁾	164.70 ± 15.86 ⁽¹⁾
Treatment/5.0 ml kg ⁻¹ d ⁻¹ × 5 d	7.52 ± 1.09 ⁽²⁾	6.69 ± 0.90 ⁽²⁾	158.70 ± 10.10 ⁽¹⁾

$n = 10$ vs control (1) $p < 0.05$ (2) $p < 0.01$

3 讨 论

骨髓抑制是放射病的主要表现之一, 是肿瘤放射治疗最常见的并发症, 严重损害造血、免疫系统, 是影响治疗效果和预后的重要因素。因此, 近年来国内、外学者致力于各种辐射防护物质的研究^[2]。葛忠良等首先应用胎儿肌组织制备了 FMCM, 并证明含有丰富的 CSF 活性^[3,4]。尽管 FMCM 的作用有种属特异性, 但人的 FMCM 对小鼠骨髓细胞有良好的刺激活性^[4]。本研究根据葛忠良的方法, 以人 AB 血浆代替马血清, 制备出 FMCM。已证实此 FMCM 中主要含有 GM-CSF, 同时具有少量 G-CSF、M-CSF, 且具有刺激红系生长的活性。文献报道这些 CSF 具有促进造血干细胞和祖细胞的生长, 减轻理化因素对造血细胞的损伤, 增强中性粒细胞和巨噬细胞功能, 诱导白血病细胞分化等功能^[2,7,8]。在辐射损伤的修复过程中, 造血干细胞(CFU-S)自身增殖的同时不断分化, 借以尽快在髓内、髓外重建造血^[1,8], 因此, CFU-S 可以反映机体在辐射损伤过程中造血组织的损伤及恢复程度。本研究证实小鼠经 6.5 Gy γ 射线全身照射后, FMCM 对辐射小鼠的 CFU-S 具有显著保护作用($p < 0.01$)和促恢复作用($p < 0.01$), 促进髓外造血重建, 延缓外周血 RBC、WBC 及 Hb 的降低, 促进辐射损伤后外周血细胞的恢复, 且初步在临床应用中取得了较好的疗效。本研究结果为临床应用 FMCM 作为造血细胞刺激因子治疗放、化疗所致的骨髓抑制, 以及放射病的骨髓损伤提供了实验依据。

参 考 文 献

- 1 申明燕, 施骏, 刘福陆等. 中华放射医学与防护杂志, 1993, 13: 89
- 2 胡璧. 中华放射医学与防护杂志, 1993, 13: 345
- 3 葛忠良, 刘秀珍, 刘雪桐. 中华放射医学与防护杂志, 1981, 1: 40
- 4 葛忠良, 刘秀珍. 细胞生物学杂志, 1985, 7: 137
- 5 葛忠良, 刘秀珍, 骆传环等. 军事医学科学院院刊, 1984, (3): 293
- 6 吴祖泽. 造血细胞动力学概论, 第1版, 北京: 科学出版社, 1978, 110
- 7 Begley C G, Metcalf D, Nicola N A. Exp. Hematol, 1988, 16: 71
- 8 Coleman D L, Chodakewitz J A, Bartiss A H et al. Blood, 1988, 72: 573

PROTECTIVE AND PROMOTING EFFECTS OF FETAL MUSCLE CONDITIONED MEDIUM ON HEMATO- POIESIS IN IRRADIATED MICE

Wei Hulai Zhao Huishun Ma Lanfang

(Institute of Hematology, Lanzhou Medical College, Lanzhou 730000)

ABSTRACT The Balb/C mice were whole body irradiated with γ -rays (^{60}Co , 6.5 Gy), and given human fetal muscle conditioned medium (FMCM) before and after irradiation, the protective and promoting effects on hematopoiesis in irradiated mice were observed. The results showed that FMCM given I. P (2.5~5.0 ml kg⁻¹ d⁻¹ × 5 d) before 6.5 Gy whole body γ -irradiation was able to protect the colony forming unite-spleen (CFU-S), and reduce the decreases of red blood cells (RBC) white blood cells (WBC) and hemoglobin (Hb) in peripheral blood; FMCM given after irradiation could effectively promote the hemopoietic reconstruction in spleen and the increases of RBC, WBC and Hb in peripheral blood. The above results suggest that FMCM has good protective and promoting effects on reducing hematopoietic damage caused by irradiation.

KEYWORDS Irradiation, Hematopoietic damage, Fetal muscle conditioned medium (FMCM), Radioprotection