

不同的照射方式对小鼠造血系统 残留损伤的影响

杨凤桐 卢绍平 彭文珍 徐承熊

(中国医学科学院放射医学研究所)

摘要 研究了剂量分割对 ICR/JCL 和 LACA 小鼠的活存率, 股骨中骨髓细胞(BMC)和造血干细胞(CFU-S)数, 以及 CFU-S 自我更新能力的影响。剂量分割对小鼠的存活率有明显的影响。在 18 Gy 照射后 2 个月, 接受 3.0 Gy 6 次照射和 4.5 Gy 4 次照射的小鼠分别活存 40% 和 15%, 但 6.0 Gy 3 次照射小鼠已全数死亡。当总剂量 12 Gy 分割成 2—4 次照射时, 大多数小鼠能活存 5 个月以上。虽然每根股骨中的 BMC 数在照后 2 个月恢复至正常或接近正常水平, 但股骨 CFU-S 含量只相当于同令对照的 40%, CFU-S 自我更新能力只相当于 25%。这种造血残留损伤在照后 11 个月时仍然存在, 在不同的剂量分割组之间未见明显的差别。

关键词 辐射残留损伤, 造血干细胞, 剂量分割。

引 言

造血系统的残留损伤是接受大剂量全身照射的机体在急性损伤恢复之后出现的一种慢性病理过程, 以造血功能的减弱为特征。在照后相当长时间内, 残留损伤动物可能不出现明显的临床症状, 外周血细胞数也维持在正常或接近正常的水平, 但骨髓中造血干细胞及祖细胞数则明显下降^[1]。在照射后晚期, 残留损伤动物肿瘤发病率增高^[2,3], 出现再生障碍性贫血及非特异性寿命缩短等临床变化^[4,5]。关于引起残留损伤的条件, 一般认为与受照射的总剂量有关^[6]。但不同的照射方式是否影响残留损伤的发生发展至今尚无统一的认识^[2,6,13]。本研究观察了总剂量相同时, 不同的剂量分割对小鼠活存率及造血系统残留损伤的影响。

材 料 与 方 法

1. 小鼠

实验采用 ICR/JCL 和 LACA 小鼠, 由本所动物室繁殖, 在实验开始时为 11~13 周龄。雌雄分开使用。

2. 照射

⁶⁰Co γ 线照射源, 照射时小鼠置分隔的塑料盒内, 小鼠中线与辐射源相距 1 米, 剂量率约 1.3 Gy/min。每次照射的剂量分成 3.0、4.0、4.5、6.0 Gy 几组, 照射次数分成 2、3、4、6 次。两次照射相隔 3 周, 总剂量分 12 Gy 和 18 Gy 两个大组。

3. 有核细胞计数

在末次照射后 2 个月, 造血系统的急性损伤已基本恢复。从这时开始, 每隔 1~4 个月对小鼠的股骨骨髓有核细胞总数进行一次测定。每一实验点由 3 只小鼠组成, 取一侧股骨, 剔除软组织

织并剪开股骨两端骨髓，用 α -MEM培养液3 ml从股骨端冲出骨髓，用通过皮试针头的方法使骨髓细胞形成均匀的单个分散细胞为主的悬液。3根股骨的细胞混合在一起，以白细胞稀释液作1:20稀释后用血球计数盘计数，计算出每根股骨的骨髓细胞均数。

4. 造血干细胞(CFU-S)测定

采用 Till 等^[7]的脾集落形成法。受体采用8.5 Gy照射的同系小鼠，由尾静脉注射受试的骨髓细胞悬液0.2 ml。调节注射的细胞量以使各组受体脾集落的均数在10左右，根据脾集落数计算每根供体股骨中的CFUS数。每组用10—20只受体，供体的骨髓悬液制备同有核细胞计数。

5. 造血干细胞自我更新能力的测定

供体的造血干细胞在注射进照射受体体内之后、有一部分在受体脾脏定居并增殖，形成造血结节。造血结节中不仅含有分化成熟细胞，也含有一定数量的造血干细胞。测定每个脾集落中CFU-S的平均含量可以作为造血干细胞自我更新能力的一个指标^[8]。8.5 Gy照射受体在静脉注射一定量骨髓细胞后11天杀死取出脾脏，剪开脾脏两端的包膜后用眼科弯剪轻轻压出脾细胞，在 α -MEM培养液中作成悬液。每只脾脏用1 ml，每组3—5只脾脏。细胞悬液混合并稀释后给8.5 Gy照射的第二受体作尾静脉注射，调节细胞量使每只受体脾脏的结节数在10只左右。8天后计数脾集落数。根据每只供体脾脏平均含有的CFU-S总数与每只供体脾脏含有的平均造血结节数计算出每个脾集落含有的CFU-S平均数。

实验结果

1. 不同的剂量分割对小鼠活存率的影响

总剂量为18 Gy时 ICR/JCL 小鼠经 6×3.0 Gy, 4×4.5 Gy 及 3×6.0 Gy 照后的活存率见图1。总剂量相同时，剂量分割次数越多，小鼠的活存率越高。雌性小鼠对射线抵抗力比雄性小鼠略高。但是，在照射后2个月，6.0 Gy 3次照射(3×6.0 Gy)组小鼠已全死亡。其它各组的活存率也大都低于50%，故总剂量18 Gy在本研究条件下显然太大，无法对残留损伤作长期追查。

当照射总剂量减为12 Gy时，在照射后5个月，各组动物的活存率都在50%以上。在照射后8个月， 4×3.0 Gy组仍有45%小鼠活存。对照动物虽然未经照射，在此期间也有部分动物死亡(见表1)。

2. 不同的剂量分割对12 Gy照射小鼠股骨有核细胞数的影响

LACA 雄性小鼠，在12 Gy照射后2~11个月作股骨有核细胞计数。从表2可见，除各组水平略有波动外，照射动物的有核细胞数未见明显下降。这说明，经12 Gy照射后恢复的

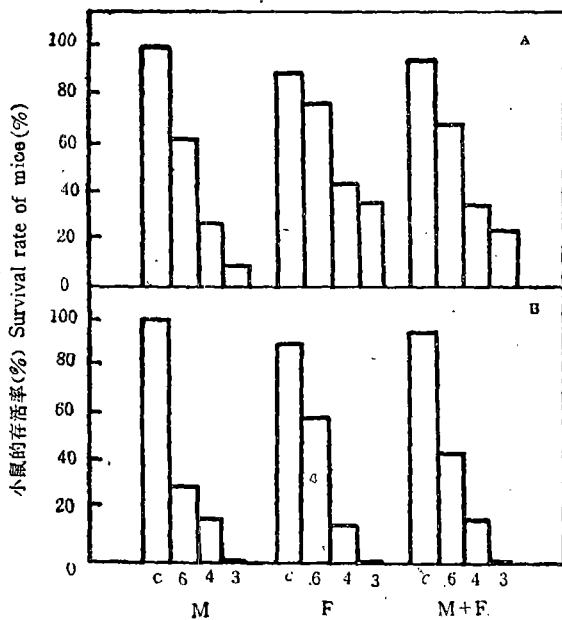


图1 不同的剂量分割对18 Gy照射小鼠活存率的影响
Fig 1 The effect of dose fractionation on the survival of mice irradiated with a total dose of 18 Gy

C: 不照射对照, 6×3.0 Gy, 4×4.5 Gy, 3×6.0 Gy 照射。每组16—20只小鼠。A: 照后1月, B: 照后2月, M: 雄性, F: 雌性。
C: Unirradiated control, 6×3.0 Gy, 4×4.5 Gy, 3×6.0 Gy. Each group is composed of 16—20 mice.
A, 1 month after irradiation, B, 2 months after irradiation, M: Male mice, F: Female mice.

表1 不同的剂量分割对 12 Gy 照射雌性 ICR/JCL 小鼠活存率的影响。
Table 1. The effect of dose fractionation on the survival rate of female ICR/JCL mice irradiated with a total dose of 12 Gy.

照射后时间 Time after irradiation (month)	对 照		4×3.0 Gy		4×4.0 Gy		2×6.0 Gy	
	活 存 %		活 存 %		活 存 %		活 存 %	
	Control		4×3.0 Gy		3×4.0 Gy		2×6.0 Gy	
	Survival	%	Survival	%	Survival	%	Survival	%
3月	20/20	100	14/20	70.0	12/20	60.0	11/20	55.0
5月	16/20	80.0	11/20	55.0	10/20	50.0	10/20	50.0
7月	12/20	60.0	9/20	45.0	4/20	20.0	7/20	35.0
8月	11/20	55.0	9/20	45.0	4/20	20.0	7/20	35.0

小鼠,造血系统能在一定程度上维持其正常功能。

3. 不同的剂量分割对 12 Gy 照射小鼠股骨 CFU-S 数的影响

与有核细胞数恢复至正常或接近正常水平成为鲜明对比的是,各照射组小鼠股骨骨髓中的 CFU-S 数的恢复始终是不完全的。在照射后 2 个月,每根股骨的 CFU-S 数约为对照组的一半,在此后的 11 个月中,一直保持在对照的 40% 左右。虽然剂量的分割次数对动物的活存时间有较明显的影响,在比较的 4×3.0 Gy, 3×4.0 Gy 和 2×6.0 Gy 三种分次照射的方案中,未见 CFU-S 的下降程度有明显的差别。各组的 CFU-S 水平均未见有恢复的倾向。照射 7~11 个月的水平比 2~3 个月略低(图 2)。

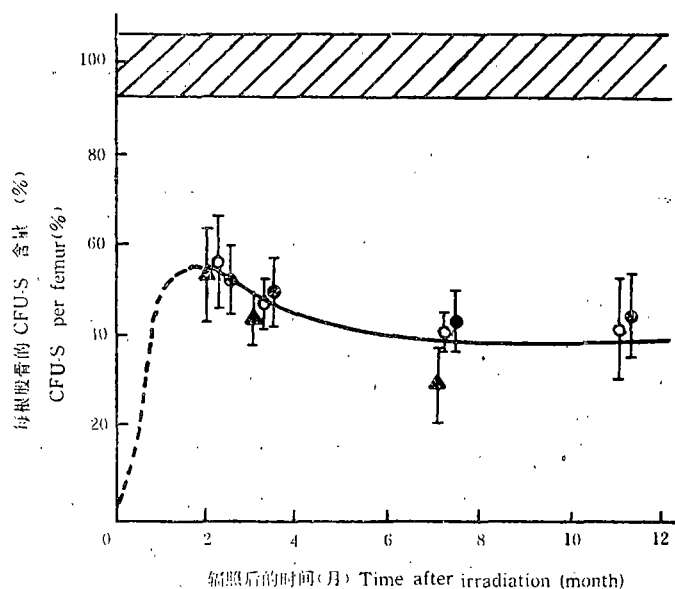


图2 不同的剂量分割对 12 Gy 照射的 LACA 小鼠股骨骨髓中 CFU-S 含量的影响

Fig 2. The effect of dose fractionation on the number of CFU-S per femur in LACA mice irradiated with a total dose of 12 Gy

对照组 CFU-S 为 4552 ± 212.8 /股骨, ▲: 4×3.0 Gy, ○: 3×4.0 Gy, ●: 2×6.0 Gy, 每点为 1—2 批实验, 每批 15—20 只受体的均数 ± SE。虚线部分系根据引文推算^[9]。

The average number of CFU-S per femur in control mice is 4552 ± 212.8 . ▲: 4×3.0 Gy, ○: 3×4.0 Gy, ●: 2×6.0 Gy. Each point represents the mean ± SE of 1~2 experiments, each composed of 15~20 recipients. The dotted line is according to the data from^[9].

表 2 不同的剂量分割对 12 Gy 照射的 LACA 小鼠骨髓有核细胞数($\times 10^6$ /股骨)的影响*
Table 2. The effect of dose fractionation on the number of bone marrow nucleated cells (BMC) of LACA mice irradiated with a total dose of 12 Gy.

照后时间 Time after irradiation (month)	对 照 Control	4×3.0 Gy	3×4.0 Gy	2×6.0 Gy
The number of BMC ($\times 10^6$)/femur				
2	11.3	12.8	12.7	12.3
3	18.7	14.8	14.3	15.0
7	13.8	12.2	14.8	16.4
11	14.2	—	9.6	12.4

*表中数字为 1~2 批实验的结果, 每批每组用 3 只小鼠的股骨。

4. 不同的剂量分割对 12 Gy 照射小鼠造血干细胞自我更新能力的影响

与每根股骨中 CFU-S 数下降的程度相比, 残留损伤小鼠造血干细胞在受体脾脏形成的集落中, 每个集落所含有的 CFU-S 平均数下降更为显著(图 3)。在照后 2~11 个月内, 各照射组的水平在对照的 20~35% 范围内波动。不同的剂量分割对结果未见明显影响。在观察的 11 个月中也未见到自我更新能力的恢复。

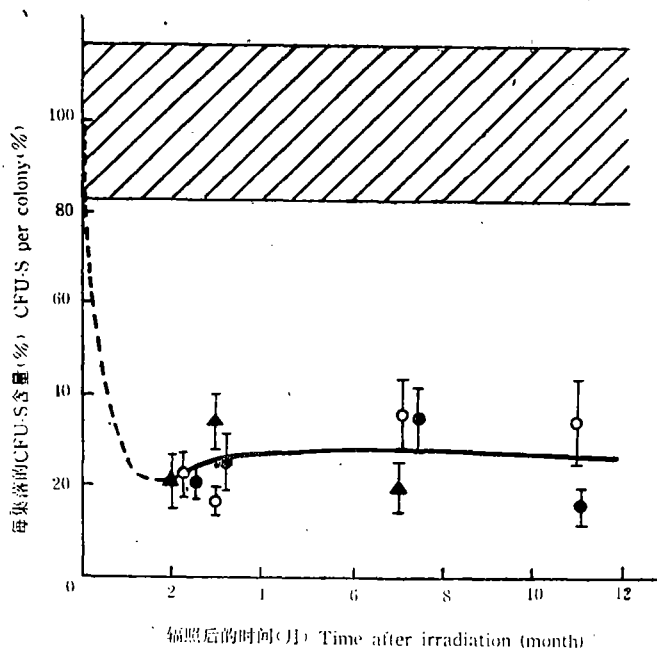


图 3 不同的剂量分割对 12 Gy 照射的 LACA 小鼠造血干细胞自我更新能力的影响。

Fig 3 The effect of dose fractionation on the self-renewal capacity of hemopoietic stem cells in LACA mice irradiated with a total dose of 12 Gy

对照组干细胞形成的脾集落平均每个含有 CFU-S 193.3 ± 32.2 个, $\blacktriangle$: 4×3.0 Gy, $\circ$: 3×4.0 Gy, $\bullet$: 2×6.0 Gy。每点为 1~2 批实验, 每批 15—20 只受体的均数 $\pm$ SE。虚线系根据引文结果推算^[10]。

The average number of CFU-S per colony in control mice is 193.3 ± 32.2 . $\blacktriangle$: 4×3.0 Gy, $\circ$: 3×4.0 Gy, $\bullet$: 2×6.0 Gy.

Each point represents the mean $\pm$ SE of 1-2 experiments, each composed of 15-20 recipients, The dotted line is according to the data from^[10].

5. 总剂量为 18 Gy 时的改变

ICR/JCL 小鼠在 18 Gy 照射后 3 个月, 6×3.0 Gy 组和 4×4.5 Gy 组尚有少数动物活存。将这些活存小鼠的股骨骨髓作有核细胞数, CFU-S 数及干细胞自我更新能力的测定结果见表 3。股骨有核细胞数似有轻度下降。CFU-S/股骨和 CFU-S 自我更新能力的下降程度与 12 Gy 照射小鼠类似。

表 3 总剂量为 18 Gy 的分次照射 ICR/JCL 小鼠在照后 3 个月时造血系统的改变*
Table 3 The changes of hemopoietic system in ICR/JCL mice 3 months after split-dose irradiation with a total dose of 18 Gy*.

		对 照 组		6×3.0 Gy		4×4.5 Gy	
		均数±SE	%	均数±SE	%	均数±SE	%
		Control		6×3.0 Gy		4×4.5 Gy	
		Mean±SE	%	Mean±SE	%	Mean±SE	%
股骨骨髓有核 细胞数(×10 ⁶)	Nucleated cells per femur (×10 ⁶)	14.5±2.0	100	11.6±0.6	80.0	12.6±0.3	86.9
股 骨 骨 髓 CFU-S 含量(×10 ³)	CFU-S per femur (×10 ³)	4.4±0.2	100	2.1±0.1	47.0	2.3±0.1	52.4
CFU-S/脾集落	CFU-S per spleen colony	155±28	100	49±7.8	31.8	47±5.4	30.2

* 两批实验, 每批每组用 3 只供体的混合骨髓及各 15 只照射受体作股骨 CFU-S 及 CFU-S/脾集落测定。

* The data are the average of 2 experiments, each using mixed marrow from 3 donors. For the assay of CFU-S per femur and CFU-S per spleen colony, 15 recipients are used.

讨 论

近年来, 由于临床上用全身照射配合骨髓移植治疗白血病及再障, 用全身分次或分部(即先照射身体的一侧, 相隔一定时间后再照射另一侧)照射治疗淋巴瘤等恶性肿瘤逐渐增多^[11]。辐射引起的造血系统的长期性损伤逐渐为人们重视^[12]。这些医疗性照射采用的剂量较大, 其远后效应与低剂量率的职业性照射不完全相同。例如, 目前对小剂量照射是否引起非特异性寿命缩短一般持否定态度^[13], 但较大剂量照射后, 可以见到小鼠寿命随照射剂量加大而缩短。死亡原因除少数与肿瘤发生有关外, 一般无特异性病变。在本研究中, 所用的 ICR/JCL 及 LACA 近交系小鼠对射线的耐受力比杂交一代(BDF₁)小鼠^[1]及非近交系的昆明种小鼠(本实验室未发表材料)要低, 照射总剂量为 18 Gy 时大都不能活存 2 个月以上。照射总剂量为 18 Gy 时虽然远期死亡率比 12 Gy 高得多, 但造血系统的变化两者无明显差别。这可能是因为在照后 3 个月进行测定时, 18 Gy 照射的小鼠中对射线较敏感的均已死亡, 测定的结果只代表了对射线比较耐受的那一部分小鼠所致。

本实验证实了 Hendry^[1]等的发现, 即残留损伤动物成熟的血细胞数量变化较小, 原始的造血细胞下降较严重, 干细胞自我更新能力的下降最明显^[14]。这表明, 残留损伤动物的造血系统动力学发生了明显的变化, 每一个干细胞必须产生更多的成熟后代细胞才能维持这种新的平衡状态。有人曾用造血干细胞自我更新机率 P 的变化来解释这一现象, 即在残留损伤动物, 干细胞分裂时产生分化后代的机率上升, 复制其自身的机率下降^[15]。当 P 值小于 0.5 时, 干细胞群体的数量就会因得不到充分补充而逐渐下降, 导致造血系统的最终衰竭。

由于在肿瘤和血液病治疗中应用全身照射的历史还不长,大剂量广范围电离辐射对人体的远期影响尚不为人们所了解。在实验动物所观察到的造血残留损伤已引起了一些临床及实验室工作者的重视,应该对它的发生机制,病程预后和防治方法等作更深入的研究。

参 考 文 献

- [1] J. H. Hendry, C. X. Xu, and N. G. Testa, *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*, 9:1641, (1983).
- [2] S. J. Baum, and E. L. Alpen: *Radiat Res.*, 11:844(1959).
- [3] 河本定久: 中华放射医学与防护杂志 2(4):1, (1982).
- [4] T. M. Seed, L. V. Kasper, D. V. Tolle, and T. E. Fritz; *Exp Hematol.*, 10(sup 11): 174, (1982).
- [5] 徐承熊: 中华放射医学与防护杂志 4(2):76, (1984).
- [6] S. Hellman and L. E. Botnick; *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*, 2:181, (1977).
- [7] J. E. Till and E. A. McCulloch; *Radiat Res* 14:213, (1961).
- [8] J. E. Till, E. A. McCulloch and L. Siminovitch; *Proc Natl Acad Sci.*, 51:29, (1964).
- [9] J. H. Hendry, N. G. Testa, and L. G. Lajtha: *Radiat Res* 59:645, (1974).
- [10] J. H. Hendry, B. I. Lord: in *The Analysis of the Early and Late Response to Cytotoxic Insults in the Haemopoietic Cell Hierarchy*. C. S. Potten and J. H. Hendry (Eds) Edinburgh, Churchill-Livingstone, PP 1~66. (1983).
- [11] J. E. Sanders, C. D. Buckner, J. M. Leonard, K. M. Sullivan, R. P. Witherspoon, H. J. Deeg, R. Storb, and E. D. Thomas; *Transplantation.*, 36:252, (1983).
- [12] N. Morardet, C. Parmentier, M. Hayat, P. Charbord: *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*, 4:853(1978)
- [13] G. Silini: 中华放射医学与防护杂志 3(1):1, (1983).
- [14] 吴祖泽, 姜学英, 沈世人, 谭绍智, 薛惠华: 中国科学 81 年 5 期 p 641.
- [15] R. Schofield, B. I. Lord, S. Kyffins, C. W. Gilbert; *J Cell Phys.*, 103:355, (1980).
- [16] C. X. Xu, J. H. Hendry, and N. G. Testa: *Exp Hematol.*, (Submitted).

(1984 年 8 月 5 日收到)

THE EFFECTS OF VARIOUS IRRADIATION SCHEDULES ON THE HEMOPOIETIC RESIDUAL DAMAGE IN MICE

Yang Fengtong Lu Shaoping Peng Wenzhen Xu Chengxiong

(Institute of Radiomedicine, Chinese Academy of Medical Sciences)

ABSTRACT The effects of dose fractionation on the survival rate, the numbers of bone marrow cells (BMC) and hemopoietic stem cells (CFU-S) per femur, and the self-renewal capacity of the CFU-S in ICR/JCL and LACA mice were investigated. It was found that dose fractionation affected the mouse survival rate significantly. At 2 months after 18 Gy irradiation, the survival rates of mice received 6 doses of 3.0 Gy and 4 doses of 4.5 Gy were about 40% and 15% respectively, but all mice died after 3 doses of 6.0 Gy. When the total dose of 12 Gy was split into 2-4 fractions, most mice survived more than 5 months. Although the number of BMC per femur recovered to normal or near normal level after 2 months of irradiation, the number of CFU-S per femur was only about 40% and the self-renewal capacity of the CFU-S was only about 25% of the age-paired controls. This kind of hemopoietic residual damage remained unchanged up to 11 months after irradiation and no significant differences were found among the various dose fractionation groups.

KEY WORDS Residual radiation injury; Hemopoietic stem cell; Dose fractionation.