

G-CSF 促进造血功能恢复及其机理的研究

张 浩 毛秉智 罗庆良 夏贞彪 董 波 从玉文 郭德煌

(军事医学科学院放射医学研究所 北京 100850)

摘要 研究了粒细胞集落生长因子 (G-CSF) 促进受辐射小鼠造血功能恢复的作用, 并对机理进行了初步探讨。结果表明: G-CSF 不仅可以促进受辐射小鼠外周血细胞的恢复, 促进脾脏内源性脾结节的形成, 而且可以增加骨髓细胞含量和促进骨髓细胞巨噬系造血祖细胞 (CFU-GM) 的形成, 提高受辐射小鼠的生存率, 其促进辐射后机体造血功能恢复的机理是通过刺激照射后残余造血干细胞的增殖、分化, 该过程需要一段较长的时间, 而不是抑制照射后即刻细胞的程序性死亡。

关键词 细胞因子, 重组人粒细胞集落刺激因子, 辐射

中图分类号 R392.1, R973.3

造血功能损伤是辐射后的主要病理变化之一, 促进造血功能的恢复是目前急待解决的问题。粒细胞集落刺激因子 (G-CSF) 促进造血细胞生成的作用业已得到证明, 但对其机理的研究不深入。为此我们以辐射小鼠为模型, 研究 G-CSF 促进造血功能恢复的作用, 并对机理进行了探讨。

1 材 料 和 方 法

1.1 动物

AMMS/5 纯系雄性小鼠 (军事医学科学院动物中心繁殖), 体重 18~22g, 8~12 周龄。G-CSF 于照射后 1~2h 内开始第 1 次给药, 皮下注射, 一天两次, G-CSF 剂量为 $125\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{d}$ 连续 7d, 对照组给予生理盐水连续 7d, 动态观察 30d 外周血象变化, 每组 10 只小鼠。

1.2 照射条件

军事医学科学院放射医学研究所 ^{60}Co γ 源, 实验小鼠一次全身照射, 照射剂量率为 88.9~94.0 cGy/min。

1.3 药物及配制

实验中所用 G-CSF 为日本麒麟公司产品, 商品名为惠尔血, 生物活性为 $3.07\times 10^7\text{U}/1.2\text{mL}$, 制剂标示量为 $300\mu\text{g}/\text{支}$ 。给药前用生理盐水稀释至所需浓度。

1.4 外周血细胞测定

小鼠尾静脉取血 $20\mu\text{L}$, 稀释后用 F-800 血细胞自动计数仪计数红细胞、白细胞、血小板和血红蛋白等指标。

1.5 小鼠肌浸液的制备

取 10 只健康小鼠, 脱臼处死, 酒精消毒, 无菌条件下取出背部和腿部肌肉, 除去附着的脂肪和肌腱, 剪成绿豆粒大小, 用含 10% 马血清的 1640 培养液漂洗 2h 后, 取肌肉粒 1g, 加入

收稿日期: 初稿 1999-08-17, 修回 1999-09-27

马血清 2mL, 1640 培养液 7mL, 置于 30mL 培养瓶中, 在 5% CO₂ 培养箱中 37 °C 培养 7d, 收集上清液, 测定活性后于 -20 °C 冻存备用。

1.6 内源性脾结节测定

6.5 Gy ⁶⁰Co γ 射线照射小鼠, 照射后 10d 脱臼处死, 取出脾脏, Bouin's 液固定 24h 后, 解剖镜下计数结节。

1.7 骨髓细胞悬液的制备

颈椎脱臼处死小鼠, 酒精消毒, 取出股骨, 用含 10% 马血清的 1640 培养液 2mL 冲出骨髓细胞, 4 号针头过滤后, 计数有核细胞数。

1.8 CFU-GM 培养

常规方法培养, 体系中各成分的终浓度为: 马血清 25%, 琼脂 0.3%, 骨髓细胞 2×10^5 /mL, 小鼠肌浸液 0.2mL/ 皿, 每组 5 皿, 置 5%CO₂ 饱和湿度、37 °C 培养 7d, 4 倍镜下计数, 50 个以上细胞为一集落。

1.9 活存率

⁶⁰Co γ 射线一次全身照射 8.0Gy 小鼠, 观察 30d 存活率。

1.10 细胞程序性死亡的检测^[1]

脱臼处死待测小鼠, 从股骨中冲出骨髓细胞, 细胞悬液取适量于 1.5mL 的管中, 加 HL 缓冲液 1mL, 混匀, 室温放置 5min, 2000r/min 离心 5min, 倾去上层液, 沉淀重复上面步骤 1 次后, 加生理盐水洗 2 次, 沉淀加细胞裂解液 250μL, 混匀, 37 °C 孵育 3h, 加入酚 / 氯仿 / 异戊醇 (25:24:1)300μL, 振荡 20s 混匀后, 10000r/min 离心 10min, 取上清加氯仿 / 异戊醇 (24:1)300μL, 振荡 10~20s 混匀, 10000r/min 离心 10min, 小心取出上层水相于另管中, 用酚 / 氯仿 / 异戊醇重复处理一次后, 加 1/10 体积的 NaAc 和 2 倍体积的无水乙醇混匀, -20 °C 过夜, 12000r/min 离心 10min, 倾去上层液, 沉淀加 70% 乙醇, 翻转混匀, 12000r/min 离心 10min, 倾去上层液, 真空干燥, 贮于 -20 °C 备用, 用前加注射用水或 100μL TE 缓冲液, 置 56 °C 1h, 使 DNA 溶解。

1.11 琼脂糖电泳

DNA 样品与上样缓冲液 5:1(V/V) 混匀, 将此混合液 10μL 置 1.8% 琼脂糖凝胶孔 (凝胶含溴化乙锭 0.5μg/mL) 中, 电泳 1.5h(电压 60V), 紫外灯下观察并照相。

1.12 统计学方法

采用 SAS 软件包, 在 PC 上进行。应用相关的分析方法。

2 实验结果

2.1 G-CSF 对外周血细胞的影响

小鼠受辐射后一个月内, 外周血白细胞的变化规律为: 照射后第 7 天白细胞降至最低值, 随时间的延长缓慢恢复, 至照射后第 23 天白细胞恢复为照前的 50% 左右。使用细胞因子可以提高不同时间点的白细胞数。照射后第 14 天、17 天 G-CSF 组白细胞比对照组高, 有明显差

异 ($p < 0.05$)。表明应用 G-CSF 可以促进急性放射病小鼠外周血白细胞的恢复 (图 1)。

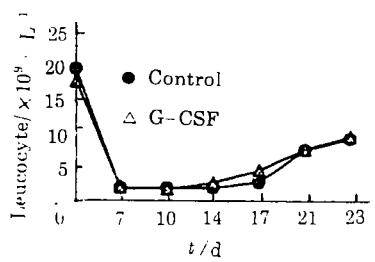


Fig.1 Effects of G-CSF on Leucocyte

小鼠受辐射后一个月内，外周血血红蛋白的变化规律为：照射后第 14 天血红蛋白降至最低值，随着时间的延长缓慢恢复，至照射后第 23 天血红蛋白恢复为照前的水平。使用 G-CSF 可以提高不同时间点的血红蛋白水平。照射后第 14 天，G-CSF 组比对照组高；照后第 21 天 G-CSF 组比对照组高 ($p < 0.05$)。表明 G-CSF 可以促进受照小鼠血红蛋白的恢复 (图 3)。

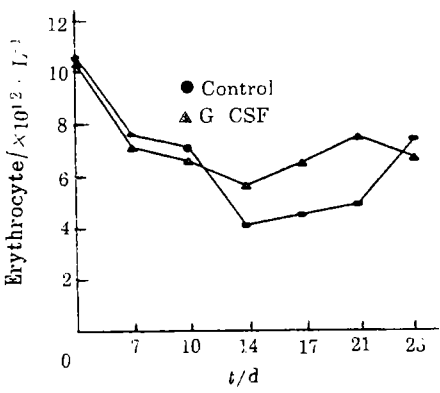


Fig.2 Effects of G-CSF on Erythrocyte

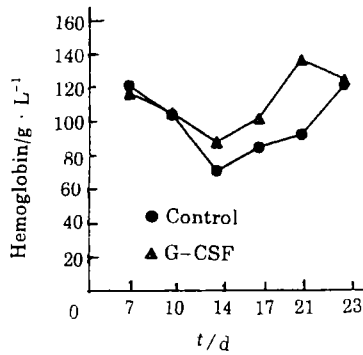


Fig.3 Effects of G-CSF on hemoglobin

小鼠受辐射后一个月内，外周血血小板的变化规律为：照射后第 14 天血小板降至最低值，随着时间的延长缓慢恢复，至照射后第 23 天血小板恢复为照前的水平。使用细胞因子可以提高不同时间点的血小板数。照射后第 14 天，G-CSF 组高于对照组，有明显差异 ($p < 0.05$)；照射后第 17 天 G-CSF 组高于对照组 ($p < 0.01$)。表明 G-CSF 可以促进照射小鼠血小板的恢复 (图 4)。综合以上实验结果，表明应用 G-CSF 可以促进照后外周血的恢复。

2.2 G-CSF 对受 8.0Gy 照射后小鼠 30 天活存率的影响

照射后第 3 天各组小鼠开始死亡，第 5~18 天为死亡高峰，G-CSF 组活存率均高于对照组。照射后第 30 天，对照组及 G-CSF 组活存率分别为 5%、20%，统计学上有明显的差异 ($p < 0.05$) (图 5)。

2.3 G-CSF 促进造血功能恢复和提高活存率的机制

2.3.1 G-CSF 对受照小鼠骨髓细胞程序性死亡 (PCD) 形成的影响 应用细胞因子促进造血功能恢复和提高活存率的机制目前不清楚。这种作用是由于抑制受辐射小鼠骨髓细胞程序性死

亡 (PCD) 的发生, 还是经过一段较长的时间, 通过刺激骨髓残余造血干细胞的增殖、分化? 我们首先选择 1.0、3.0、6.5、8.0Gy 不同照射剂量, 观察了照射后 0、4、8、24、48h 不同时间点, 骨髓细胞发生 PCD 的情况。在照射后 24h 内, 不同照射剂量组骨髓细胞中仅 8.0Gy 照射剂量组出现 PCD(图 6), 照后 48h 各照射剂量组均观察到明显的 PCD。说明辐射引起骨髓细胞 PCD 的形成不是即刻发生, 而是需要一定的时间。另外, 从图 6 中可以发现照射剂量的大小与骨髓细胞发生 PCD 的早晚有一定关系。

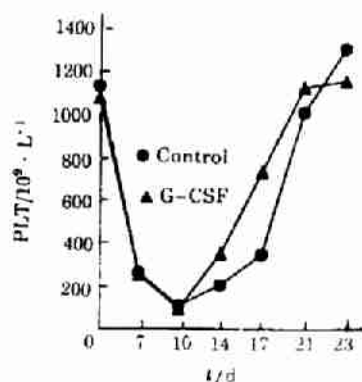


Fig.4 Effects of G-CSF on PLT

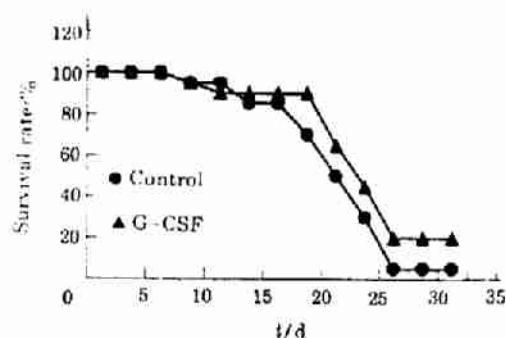


Fig.5 30th survival rate of irradiated mice



Fig.6 Effect of irradiation on PCD of bone marrow after 24h

1 1.0Gy, 2 3.0Gy, 3 6.5Gy, 4 8.0Gy



Fig.7 Effect of G-CSF on PCD of bone marrow in irradiated mice after 48h

1 control, 2 G-CSF

由于我们的研究重点是观察 G-CSF 能否抑制骨髓细胞发生 PCD, 我们选择 8.0Gy 照射后 48h 能够出现明显 PCD 的时间点进行了观察。结果发现照后 48h 给予 G-CSF 的治疗组小鼠的骨髓细胞依然出现 PCD, 表明 G-CSF 不能抑制照射引起的 PCD 发生(图 7)。

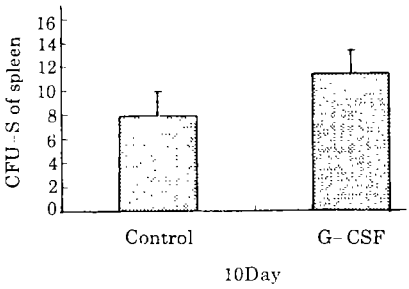


Fig.8 Effect of G-CSF on CFU-S of irradiated mice

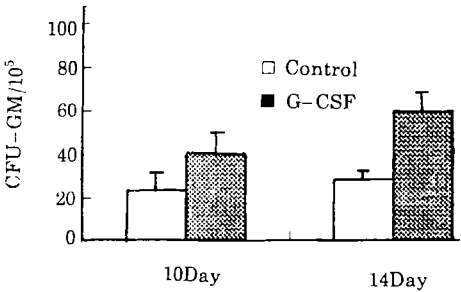


Fig.9 Effect of G-CSF on CFU-GM of bone marrow

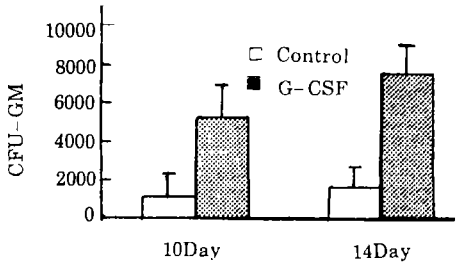


Fig.10 Effect of G-CSF on the cell number of bone marrow

3 讨 论

丛玉文等^[2,3]观察了应用 G-CSF 促进受辐射小鼠造血功能恢复的作用。本工作着重对该机理进行探索。为了探讨 G-CSF 促进造血功能恢复和提高活存率的机制,研究了 G-CSF 对受照射小鼠骨髓细胞 PCD 形成的影响。结果表明, G-CSF 不能抑制辐射引起骨髓细胞程序性死亡, G-CSF 可以促进内源性脾结节 CFU-S 的形成、骨髓细胞含量和骨髓细胞 CFU-GM 形成,表明 G-CSF 具有刺激干细胞增殖、发育的作用。其促进照射后机体的造血功能的恢复是通过刺激残余骨髓造血干细胞的增殖、分化,该过程需要一段较长的时间,而不是通过抑制照射后即刻细胞的程序性死亡。照射剂量低,造血功能损伤轻、造血功能恢复快。由于本研究重点是观察 G-CSF 能否抑制骨髓细胞发生 PCD,我们只观察了 G-CSF 对 8.0Gy 照射小鼠 PCD 形成的影响,不同剂量照射后造血功能恢复的机理存在差异,以及低剂量时 G-CSF 抑制照射后细胞程序性死亡的作用。另外我们发现在照后不同时间点, G-CSF 对外周血的白细胞、红细胞、血小板有明显的促进恢复作用,由于实验目的的原因,我们未对 48h 以后的时间点进行观察,是否照射后这段时间内还存在抑制 PCD 的作用,都是值得探讨的问题。由于 G-CSF 具有多效性,它们很可能还作用于其它系统(如免疫系统),使之功能改善,造血和其它系统功能的改善最终反映的结果是活存率的提高,但具体机制相当复杂,有待于进一步研究。已发现多种细胞因子具有刺激造血功能恢复的作用^[4~8]。单用细胞因子存在作用单一性的缺点,合

2.3.2 G-CSF 对照射小鼠内源性脾结节的影响 照射后第 10 天, G-CSF 组内源性脾结节有增加趋势(图 8)。表明 G-CSF 对小鼠 CFU-S 的形成有一定促进作用。

2.3.3 G-CSF 对骨髓细胞含量和骨髓细胞 CFU-GM 形成的影响 照射后第 10 天对骨髓细胞 CFU-GM 形成,给药组高于对照组,照射后第 14 天, G-CSF 组对 CFU-GM 形成尤为明显 ($p < 0.01$)(图 9);照射后第 10、14 天 G-CSF 组的造血细胞含量与对照组有明显差异 ($p < 0.01$)(图 10)。

理的细胞因子联用会提高疗效或抵消单用细胞因子时存在的局限性和副作用,但要避免不合理联用时可能出现的拮抗作用。这需要对造血因子调控制造血的机理进行深入的研究,根据治疗目的不同,制定出合理的联用方案。

参 考 文 献

- 1 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning- Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- 2 Cong Y W, Mao B Z, Luo Q L *et al.* J PLA Med (in Chinese), 1996, 21(3):174-176。
- 3 Cong Y W, Mao B Z, Luo Q L *et al.* Bull Acad Mil Med Sci (in Chinese), 1996, 20(1):11-14
- 4 Laterveer L, Lindley I J, Hamilton M S *et al.* Blood, 1995, 85:2269-2275
- 5 Jackson J D, Yan Y, Brunda M J *et al.* Blood, 1995, 85:2371-2376
- 6 Lane T A, Law P, Maruyama M *et al.* Blood 1995, 85:275-282
- 7 Andrews Rg, Briddell R A, Knitter G H *et al.* Blood, 1995, 85:15-20
- 8 Brasel K, McKenna H J, Charrier K *et al.* Blood, 1995, 86(Suppl.1):463a.

THE STUDY OF THE REHABILITATE EFFECT OF G-CSF ON HEMATOLOGICAL FUNCTION AND ITS MECHANISM

ZHANG Hao MAO Bingzhi LUO Qinglang XIA Zhenbiao

DONG Bo CONG Yuwen GUO Dehuang

(*Institute of Radiation Medicine, Academic Military Medical Sciences, Beijing 100850*)

ABSTRACT This article is to study the rehabilitate effects of G-CSF on hemotological function and its mechanism. The results indicate that G-CSF can not only accelerate the recovery of peripheral blood, promote the recovery of endogenous CFU-S, but also increase the number of bone marrow cell and stimulate its CFU-GM. It can raise the 30th days survival rate of irradiated mice. The mechanism is due to accelerative action on the recovery of hematological function in exposed mice. This procedure needs a long time. It is not due to the inhibitory upon programmed cell death of cells.

KEYWORDS Cytokine, G-CSF, Irradiation

CLC R392.1, R973.3