

造血微环境的辐射损伤及其意义

军事医学科学院 陈家佩综述

中国医学科学院放射医学研究所 徐承熊审

近十余年来,有关造血间质微环境的研究颇为活跃。不少报导说明:造血间质微环境在造血干细胞及其后代的定居定向、增殖分化、成熟乃至释放的全过程中起着诱导,支持和调控作用。造血微环境业已成为实验血液学和临床血液学中的专门术语。这一术语或泛指造血器官内除造血实质细胞以外所有参与调控造血的间质成分;或特指造血组织中一些具有特殊结构和功能的微细区域——龕(niche)。

造血器官是辐射敏感组织。照射后,造血功能受损,其直接表现是造血实质细胞的变化。造血干细胞及其后代被大量杀伤。除部分幸存外,大多在照射后短期内死亡。因此,对造血实质细胞照后的变化规律方面的研究颇受重视。致力于移植或输注造血细胞以期重建造血的探索屡有报导。但是,照射后造血微环境的损伤如何?残存的或输入的造血细胞能否在功能严重受损的造血微环境中启动增殖并填充髓腔?是否可能通过改善造血微环境使幸存的造血干细胞及早增殖,自我重建造血?这些问题迄今研究尚少。

一、造血微环境的辐射效应

1906年Besgonie和Tribondeau提出:细胞的辐射敏感性与其增殖能力成正比,与其分化程度成反比。这一认识以后被公认为定律,并逐渐由细胞水平扩展应用到组织和器官水平。这一定律促进了放射生物学的发展;迄今仍是讨论细胞和组织辐射敏感性的基础。

正常情况下,造血微环境中的间质细胞成分更新甚慢。因此,在一个很长的时期内,造血间质被列为具有较大辐射抗性的组织。

然而,近十年来用皮下移植造血器官和体

外培养间质细胞等方法证明:造血微环境具有相当高的辐射敏感性,射线可以造成造血微环境的损伤。

(一)皮下移植造血器官内的造血

股骨或脾脏移植到另一宿主腹部皮下后,其中的造血细胞迅速消失,随后间质成分增生,血窦重建而重新造血。移植物中新生的造血细胞来源于宿主的造血干细胞;而其间质微环境成分则属供体所有。宿主的造血干细胞在皮下移植物中生长的多寡取决于植入物中造血微环境功能的完善程度。因此,皮下移植造血器官常被用来检测照射后造血微环境的功能状况和辐射敏感性。

Fried W.等所在实验室用皮下移植造血器官的方法进行了大量研究^{1~5}。实验发现:正常股骨移植到另一健康宿主腹部皮下后8周,能测出CFU-s 600个。股骨移植前1天,小鼠经 γ 线照射750、950和2500拉德,8周后移植物中的CFU-s分别只有100、8和0个。在研究移植物中CFU-s数的增长动态时观察到:正常股骨在移植后第二周起,CFU-s指数式升高,6周达坪值,约500左右。950拉德照后6周的小鼠股骨植入皮下后,CFU-s增长极为缓慢,移植后18周还只有正常股骨移植物的80%。正常脾移植于皮下后2~18周内,可查到20~60个CFU-s;而950拉德照射小鼠的脾脏在移植后的18周内几乎没有CFU-s在其中生长。作者指出,引起造血微环境功能损伤所需的射线剂量约为500拉德。500拉德可使部分动物的造血微环境功能发生轻微障碍;600拉德则全部动物的造血微环境功能受损。700~1000拉德照后,造血微环境支持CFU-s生长

的功能严重受损,而且持续很久而无恢复。

其他实验室用皮下移植股骨的方法获得:股骨造血间质微环境辐射功能损伤的阈剂量为350⁶和400拉德^{〔7〕}。照射剂量增大则损伤持续长久^{〔4,8,7〕}。

皮下移植股骨所得造血微环境辐射效应的剂量曲线为一带有较宽肩部的直线。用直线回归法测得的D₀值为434拉德, n = 1.32^{〔7〕}。

以速冻速融破坏造血微环境中的细胞成分后,再进行造血器官的皮下移植。移植物丧失支持CFU-s增殖和摄取铁-59的能力。因而推测:在造血微环境中起主要作用的是某种细胞^{〔2〕}。

造血间质细胞中研究较多的是成纤维细胞。

(二) 体外培养造血间质细胞的成灶能力

当造血细胞体外单层液体培养或甲基纤维素培养时,贴壁部分的细胞可增殖成细胞团。团内细胞形态极似成纤维细胞。培养后生成的成纤维细胞团数与种植的造血细胞数呈线性关系,说明细胞团的发育来源于单一细胞。这样的成纤维细胞细胞团经多次培养传代后,仍保持其供体造血组织的特性,在异位移植后可转移并重建特异的造血微环境,生成原属的造血组织并开始造血。因此成纤维细胞被认为是与造血微环境有关的主要细胞^{〔9,10〕}。测定成纤维细胞照后存活能力和复制成细胞团的能力亦成为评价造血微环境辐射损伤效应的指标之一。

造血间质细胞体外培养后生成细胞团的能力的检测方法有如下优点。1. 不仅适用于啮齿类动物,也可广泛应用于其他各类动物。人类的骨髓细胞也能培养测定。2. 避免了皮下移植造血器官时缺血的影响。3. 能在细胞增殖过程中暴露造血微环境中细胞所存在的潜隐性或轻微损伤。

培养结果发现,人体骨髓细胞经钴-60γ线600伦照射后,成纤维细胞生成细胞团的能力完全被抑制^{〔11〕}。豚鼠骨髓细胞在γ线400伦照射后,生成的成纤维细胞细胞团比正常减少一半^{〔12〕}。小鼠接受150伦全身照射后5分钟,骨

髓细胞培养后生成的成纤维细胞细胞团数就比正常动物降低约40%,6小时有恢复,但自第2天起又进行性下降,第6天达最低值水平,只有正常值的10%左右。以后逐渐增多,25天时基本接近正常水平^{〔13,14〕}。900拉德所致变化更剧。照后1天的小鼠骨髓细胞培养时,成纤维细胞细胞团数就减少到正常的4~6%。照射后输注正常骨髓细胞的动物恢复较快^{〔14〕}。

Werts ED等以1000、5000和10000拉德X线照射小鼠右后腿。照后3、7天及1、3、6月分别观察动物左右两侧股骨和脾内的造血情况和间质细胞体外培养生成细胞团的能力。作者发现,造血再生和间质细胞生成细胞团的能力关系密切。1000拉德照后,被照区骨髓间质细胞生成细胞团的能力严重抑制,但能恢复到正常水平,造血亦可重建。5000及10000拉德照射后,局部骨髓的间质细胞在培养体系中未能生长,造血亦无恢复趋势。全身照射使小鼠骨髓间质细胞生成细胞团的能力抑制到正常水平的37%所需要的剂量为250~320拉德。照射剂量超过600拉德时,间质细胞成灶能力的恢复不明显^{〔15~19〕}。

有的作者作了造血间质细胞在培养体系中生成细胞团能力的剂量存活曲线。所得D₀值的n值列入表中。

由表可知,射线损伤骨髓间质细胞生成细胞团能力的D₀值界于122~230拉德;略高于骨髓造血干细胞。

射线抑制胸腺巨噬细胞和成纤维细胞复制成灶能力的D₀值为125和600拉德^{〔24〕}。

(三) 肾膜下移植造血组织内的造血

实验发现:小鼠股骨骨髓埋植于另一小鼠肾包膜下,数周后能发育为骨组织并重建造血。异位移植物中新生的造血细胞系来源于宿主的造血干细胞,而造血间质微环境成分却为供体来源。移植物内的细胞数与建立造血微环境的间质细胞数量成比例。移植物中造血的旺盛程度取决于造血微环境的功能状况。因而,国外采用肾膜下移植造血组织后测定移植物中造血细胞数,用以判断造血微环境的辐射损伤

动物	射线种类		D_0 值 (rad)	n值	文献
豚鼠	钴-60		178±15	1.44	[20]
豚鼠	钴-60	中心部分骨髓细胞	128±25	3.5±0.8	[21]
豚鼠	钴-60	边缘部分骨髓细胞	122±10	2.5±0.6	[21]
小鼠	钴-60	按 10^6 细胞计	178 D_{37}		[22]
小鼠	钴-60	按绝对数计	200~300 (D_{37})		[22]
人	钴-60		163	2.2	[23]
豚鼠	钴-60	贴壁前照射	187±16	1.5	[14]
豚鼠	钴-60	贴壁后照射	216±2	1.2	[14]
小鼠	钴-60		216±36	1.1	[14]
小鼠	X-线	离体照射	230	1.2	[19]
小鼠	X线	整体照射	215	1.6	[19]
小鼠	X线	离体照射	154±11	2.6±0.38	[37]

程度。此法可能优于间质细胞在培养体系中成灶能力的测定法。因为在体外可以增殖成灶这些间质细胞，在体内不一定都参与造血微环境的建立。此法可能也优于皮下移植法。因为皮下移植股骨后6周，其中所能测得的CFU-s数仅为正常股骨的10%左右，而移植到肾膜下的股骨在1月后CFU-s已增长到正常股骨水平。肾膜下血管丰富，因而减少了皮下移植股骨时缺血的影响，故而可能较好地反映造血微环境的辐射效应和辐射敏感性^(25、26)。

小鼠整体照射而后异位移植其骨髓，400拉德即能明显抑制异位造血，其 D_0 值为325±25拉德， $n=3.5$ 。若在体外照射骨髓块，则500拉德尚不能引起明显的移植体内造血抑制，只有当照射剂量大于500拉德后，随着照射剂量的增大而异位造血指数式减少；其剂量效应曲线的 D_0 值为444±5拉德， $n=5.2$ 。0.85MeV快中子照射后之 D_0 值则为161±19拉德， $n=1.4$ 。中子的RBE值为2.0~2.5，与造血干细胞的效应相近^(26、28)。

(四) 微血管系统的形态和功能

造血微环境大致包括微血管系统，神经成分和基质结缔组织成分。迄今尚缺少分别研究造血微环境各组成部分辐射损伤效应和辐射敏感性的系统资料。这可能与研究时间短而难度大有关。

Knospe WH等强调了骨髓血窦结构的变化与照后造血功能的密切关系。大鼠股骨经2000拉德局部照射后，该区骨髓在最初7天和照后2~3月可出现初次和再次造血功能低下，同时血窦结构破坏，舒张出血，血窦数减少。但6~12月后，血窦微血管再生，结构恢复，造血亦见正常。4000拉德以上的局部照射后，变化也大致如此。但照后6~12月时血窦结构并无修复，骨髓永久性再生不良^(27、28)。

田牛等多年来研究照射后造血器官的微循环的变化。他们发现600~825拉德照后，大鼠骨髓微血管形态和功能都有改变。可见血窦壁断裂，血管内皮细胞和基底膜以及平滑肌细胞的微细结构的明显变化，微血管通透性增高以及血球聚集形成微小血栓等现象⁽²⁹⁾。

(五) 体外培养体系中贴壁细胞层的功能

近年来为模拟体内造血微环境采用了两次接种骨髓细胞的体外培养体系。第一次接种骨髓细胞用来建立贴壁细胞层。然后再在贴壁细胞层上接种第二次骨髓细胞。10年来的实验证明：尽管这样的贴壁细胞层与体内的造血微环境还相差很远，但它对于造血干细胞在体外培养体系中的生存和活动具有重要意义。它能使造血干细胞维持一个较长时间的生长增殖和分化⁽³⁰⁾。

如用X线照射贴壁细胞层，即使剂量只有

25拉德，贴壁层细胞数并未减少，但贴壁细胞层支持CFU-s增殖的能力已明显减弱；培养液中的细胞总数和CFU-s数大为减少，造血干细胞的生存时间亦明显缩短^{〔31〕}。

综上所述，多数作者认为：造血微环境有相当高的辐射敏感性。在射线作用后，造血微环境的建立及其支持造血细胞增殖的功能受到抑制；造血微环境中的微血管系统可见形态和功能的变化，间质细胞在体外培养体系中活存能力和增殖能力明显减弱。引起造血微环境辐射效应所需的剂量因实验条件和研究方法不同而有差别。皮下移植股骨法约为350~500拉德，肾膜下移植骨髓法介于350~450拉德，体外间质细胞培养的损伤阈剂量更低。

少数作者报导造血微环境有较高的辐射抗性。大鼠1000伦照射后，其骨髓、脾、胸腺以及淋巴结荒芜。但造血微环境仍能支持健康大鼠的造血细胞通过被吻合的主动脉来此定居和生长；使造血在短期内恢复而动物免于死亡^{〔32〕}。1200伦照射狗的造血微环境能接受造血细胞的移植^{〔33〕}。唯前者不能排除造血微环境成分同时循环到照射大鼠的可能性，后者在后期发生骨髓纤维化，显示造血微环境的某种异常。

二、造血微环境辐射损伤的特点和意义

造血微环境的辐射敏感性不如造血干细胞高。能急剧杀伤造血干细胞的射线剂量不一定能造成造血微环境的明显损伤。但是，造血微环境辐射损伤的特点和重要性在于：

(一) 造血微环境的辐射损伤持续久恢复慢

小鼠950拉德照后6周，股骨中CFU-s数已趋正常。但照后9周取其股骨移植到另一宿主腹部皮下后6周，移植物中所测得的CFU-s数只有正常股骨移植物的20%^{〔4〕}。600~800拉德照后3个月，小鼠股骨内CFU-s数已接近正常水平，但股骨移植后所能容纳的CFU-s含量却非常明显地低于未照射的股骨移植物^{〔7〕}。

可见，造血微环境的辐射损伤持续较久。

(二) 造血微环境的辐射功能损伤可加重

其后较小剂量照射后的造血破坏

小鼠在950拉德照射后静脉输入正常骨髓细胞。7周后小鼠股骨中CFU-s水平已经恢复；其骨髓CFU-s形成外源性脾结节的能力亦属正常。但若此时给予300拉德照射，则股骨骨髓中CFU-s数的减少程度较仅一次照射300拉德者为剧，恢复亦慢^{〔24〕}。

小鼠每隔24天照射450拉德。照后检测股骨CFU-s的减少和修复。发现第4次照射后，CFU-s的恢复速率明显减慢^{〔35〕}。说明造血微环境在射线作用后可表现有潜隐性的残留损伤，在造血组织再度遭受破坏和修复过程中又显露出来。

(三) 造血微环境的辐射损伤是放射病造血功能障碍的损伤加重因素和修复延缓因素

股骨造血微环境功能的辐射损伤影响CFU-s在其中的增殖速度。950拉德照射小鼠的股骨移植后18周，移植物中的CFU-s数还达不到正常股骨移植后6周即能达到的水平^{〔4〕}。照后早期骨髓中血窦破坏出血渗出，加上网状细胞吞噬活性的增强，加剧了骨髓的荒芜。而血窦之修复不力，破碎细胞和崩解产物不能及时清除又会延缓造血的修复^{〔20〕}。

完善的造血微环境的存在是造血干细胞种植的必要条件。因此，造血微环境的辐射功能损伤势必加剧放射病时的造血功能障碍。

(四) 造血微环境的损伤可以是骨髓长期再生不良的原因

Knospe WH等观察到，4000拉德以上的X线局部照射后，尽管体内尚有大量正常造血干细胞，但由于微血管血窦结构未能修复，因而照射区可见到永久性的骨髓造血功能低下。这时必须刮去病变的造血微环境，并将健康的骨髓细胞连同其间质成分直接注入骨髓腔中，待血窦的结构与功能完善后，造血才见改善^{〔28〕}。

West ED等也见到小鼠局部照射后造血功能的恢复与否与间质细胞的活存及复制能力有平行关系。5000拉德照后，间质细胞在体外培养体系中不能生长，造血亦不见恢复^{〔10〕}。

临床上亦常见乳腺癌患者局部大剂量放射治疗后,胸骨局部长期骨髓再生不良的现象⁽⁸⁰⁾。

因此,在研究并改善放射病造血功能时,必须充分考虑到造血微环境辐射损伤的存在。

结 束 语

造血微环境有相当高的辐射敏感性。引起造血微环境辐射功能损伤所需的射线剂量恰好在急性放射病骨髓综合征的剂量范围之内。在正常情况下,造血微环境和造血细胞之间构成互相影响互相制约的动态平衡的统一体。造血微环境的病变必然会不同程度地直接或间接影响造血干细胞的生理状态和性能。造血微环境的辐射损伤持续时间颇久。随着照射剂量的加大,造血微环境的损伤将更趋严重而持久,结构的病变亦将更为明显,它在放射病造血功能低下的发生和恢复中所起的作用必将更形重要。因此,研究照射后造血微环境的损伤发生规律和机理,对阐明辐射血液学损伤的发病原理和修复机制,对寻求自找重建造血的途径至为重要。这对提高造血干细胞移植效果,提高急性放射病的救治水平亦有实际意义。

参 考 文 献

1. Fried W et al, Blood 40, 948, 1972.
2. Fried W et al, Clin Res 20; 785, 1972.
3. Chamberlin W et al, Blood 42; 1008, 1973.
4. Chamberlin W et al, Blood 44; 385, 1974.
5. Fried W et al, Exper Hematol 4(5); 310, 1976
6. Ploemacher RE et al, IRCS 7; 234, 1979
7. 陈家佩, 刘秀英; 放射医学与防护 (3); 43, 1980.
8. 堀田知光 等; 日本血液学会杂志 41; 276, 1978.
9. Фриденштейн АЯ и др, Проб Гемат Перел Крови 18 (10):14, 1973.
10. Friedenstein AJ, Transplantation 17(4); 331, 1974.
11. Панасюк АФ и др, Проб Гемат Перел Крови 17 (8); 34, 1972.
12. Джаракьян ТК и др, ДАН СССР 215(4); 1007, 1974.
13. Горская ЮФ и др, БЭБМ 81 (5); 614, 1976.
14. Ладчик НВ и др, Радиобиол 19(6); 848, 1979.
15. Wests ED et al, Radiat Res 67; 541, 1976.
16. Wests ED et al, Radiat Res 71; 214, 1977.
17. Werts ED et al, Radiat Res 74; 466, 1978.
18. Werts ED et al, Radiat Res 81; 20, 1980.
19. Werts ED et al, Exper Hematol 8(4); 423, 1980.
20. Кузьменко ГН и др, БЭБМ 74(10); 94, 1972.
21. Конопляшников АГ и др, Радиобиол 13 (1); 138 1973.
22. Wilson FD et al, Exper Hematol 2; 343, 1974.
23. Владимирон ВГ и др, Мед радиол 24 (6); 75, 1979.
24. Watkins EB et al, in « Abstracts of the 6th International Congress of Radiation Research 18~19/V Tokyo » 213, 1979.
25. Чертков ИИ и др, БЭБМ 83(2); 206, 1977.
26. Chertkov JL et al, Radiat Res 79(1); 177, 1979.
27. Knospe WH et al, Blood 28; 398, 1966.
28. Knospe WH et al, Blood 31; 400, 1968.
29. 田 牛, 内部资料, 1980.
30. Dexter TM et al, in « Methods in Cell Biology » 14; 387 (Ed by psescott DM.) Academic press New York; 1976.
31. Dexter TM, in « Hemopoietic Cell Differentiation » Ed by Golde DW, Academic press New York p, 163, 1978.
32. 方肇辉 等; 日本血液学会杂志 37(4); 378, 1974.
33. Flidner TM et al, 同24, p.310, 1979.
34. Kedo A et al, Cell Tissue Kinet 9(6); 541, 1976.
35. Hendry JH, Radiat Res 52; 309, 1972.
36. Syles MP et al, Cancer 17(9); 1144, 1964.
37. Xu CX et al, Biomedicine Express 35; 119, 1981.