

比,活跃转录中的染色质易受更严重损伤,而修复也最快,靠近核基质处的损伤优先修复。

有关基质对修复的重要作用,也许就体现在修复后 DNA 与基质的结合方式上。Cook 等认为,电离辐射的致死效应可能是由于 DNA 修复过程中错误结构的引入。现已发现核基质上的特异性 DNA 附着位点,其中大部分位点含有一个一致顺序,这种一致顺序可结合一种基质酶,即拓扑异构酶 I。拓扑异构酶 I 除了作为核基质成分外,还参与 DNA 变构,为 DNA 复制所必需,也可能为修复所必需。有趣的是,这种酶活性在类球体中比在单层中低。现在应当明白,对双链断裂的修复,不仅需要断裂末端的正确重接,而且需要整个 DNA/蛋白质结构的复原。

## 八、结 论

已有许多证据表明,细胞核中 DNA 组构状态在 DNA 损伤和修复中起着重要作用,而且 DNA 包装上的差异可影响对初始 DNA 单、双链断裂的准确定量。用诸如中性洗脱、类核等方法测定初始 DNA 损伤,再结合 DNA 修复能力测定,可作为细胞固有辐射敏感性的指示。现在仍不清楚活细胞中 DNA 包装如何影响 DNA 修复。结构上的差异可改变损伤的性质、修复酶的功能和定位,还可影响修复系统的诱导或改变 DNA 高级结构的复原。首先需要解决的问题是,确定什么细胞结构影响对 DNA 链断裂的测定。这一信息将有助于进一步了解 DNA 组构状态如何影响 DNA 修复。

(Int J Radiat Biol 1992, 62(4): 389-396(英文) 李士生

节译 穆传杰校)

# 大鼠重组干细胞因子对小鼠的辐射防护作用

Zsebo KM et al

**摘 要:**受致死剂量的小鼠用重组大鼠干细胞因子(rSCF)处理,可刺激受致死性照射小鼠的造血明显恢复。照射前后注射 rSCF 产生最佳防护效应提示, rSCF 不仅保护造血细胞免受早期辐射损伤,而且也刺激照射后造血恢复,说明重组大鼠干细胞因子处理对小鼠具有辐射防护作用。

干细胞因子(SCF)是小鼠 Sl 位点的产物,同时也是小鼠白斑位点编码的 c-kit 酪氨酸催化酶受体的配体。SCF 的生物学性质证明; SCF 作用于非常幼稚的干细胞群,有与 IL-1 相同的抗放作用。本研究表明 rSCF 可刺激受致死性照射小鼠的造血明显恢复,从而使小鼠存活。

实验使用 10~12 周雌性(C57B1/6J × DBA2)F<sub>1</sub>小鼠,从饲养实验室取回后,适应饲养 5 天再用。小鼠受到不同剂量的铯源照射,分次照射强度相等,时间间隔 4 小时。在不同的时间间隔内,经尾静脉或腹腔给小鼠 rSCF (100 μg/kg) 或 0.1% 胎牛血清溶液。

rSCF: 用含有适量质粒的大肠杆菌制备,提纯后的 rSCF 与聚乙二醇(PEG)偶合。用

PEG 修饰的牛血清白蛋白作为对照,以测定抗放活性。纯 rSCF 浓度为 0.92 mg/ml, 其中内毒素含量 < 0.5 ng/ml (用 Limulus 变形细胞测定)。

骨髓分析: 用含 2% 胎牛血清的 Hepes 缓冲液冲洗股骨干收集骨髓细胞,在细胞计数板上计算结晶紫染色后的有核骨髓细胞数。按 Bradley 法测定高增殖潜能克隆形成细胞(HPP-CFC)和粒/巨细胞克隆形成细胞。培养物培养 14 天后,在解剖显微镜下检测克隆形成。HPP-CFC 的计数标准: 克隆直径 > 0.5 mm, 至少含 5 万个细胞/克隆。EMT-6 条件培养基是刺激 HPP-CFC 因子的来源。将多个重组因子作一组合亦可获得同样结果。GM-CFC 计数的标

准在巨细胞克隆刺激因子(rhSCF-1/1600单位·皿)作用下,含50个细胞以上的克隆。

外周血分析:用心脏穿刺法取外周血样,将血收集到含EDTA的试管中,在Sysmex微细胞计数器上计数RBC,WBC,血球容积及血小板。

血培养:在照射后第8,10,11天,用CO<sub>2</sub>窒息法处死小鼠。心脏穿刺取血在超净台内进行。将0.1ml血接种到含有胰蛋白酶解酪蛋白大豆肉汤或硫甘醇酸盐液体基质的试管中并在35℃培养7天,然后用标准法检测细菌。

血清化学:收集未加抗凝剂的全血清,用自动血清化学分析仪计算血清化学成份值。分析血尿氮、血钾、血白蛋白、总蛋白和肌酐值,每天10只小鼠为一组。

组织病理学:在照后不同时间处死小鼠,取其心脏、肺脏、肝脏、脾脏等进行大体及显微镜观察。少数小鼠的胆囊、周围神经、自主神经节及皮肤也作检查。在不同水平和纵横断面上,将小肠、大肠及盲肠制成多个切片,切片3μm厚,组织保存在10%的福尔马林中,H-E染色、三色和革兰氏染色,显微镜下观察。

## 结 果

### 1. 治疗时间对rSCF放射防护作用的影响

用9~12Gy的各种剂量照射小鼠,以测定研究用的BDF<sub>1</sub>小鼠的照射致死量。结果11.5Gy为研究用的致死剂量,实验采用静脉注射。

与对照组比较,rSCF注射组小鼠的存活率增高,存活率与治疗时间有关。照射后4小时注射一次rSCF,对致死性照射无防护作用,但在照后12天有一半小鼠存活,对照组则全部死亡。照前20小时及2小时注射rSCF,80%的小鼠长期存活。照射前后与注射结合(-20h,-2h,+4h),可使小鼠全部存活。选用rSCF最佳方案(-20h,-2h,+4h),当照射间隔4h,剂量从11.5Gy渐增至15.5Gy,受照射小鼠的LD<sub>50/30</sub>为3Gy,LD<sub>100/30</sub>为15.5Gy,辐射防护系数达1.30~1.35。为了检测受这些剂量照射后造血恢复的

作用,给受照11.5Gy和13.5Gy的小鼠在照后4小时静脉注射正常同系供体一个股骨骨髓的1/10细胞,使之全部存活,未接受骨髓移植的对照组全部死亡。

### 2. rSCF在受致死剂量辐射小鼠造血恢复中的作用

为了研究rSCF对造血恢复的效应,给受11.5Gy照射鼠注射rSCF或载体。在照后第0,1,3,6,8,10,14及21天分别处死小鼠,收集其外周血及骨髓。11天时,载体组全部死亡,而rSCF组无一死亡,并持续生存超过30天的研究期。11.5Gy如作为一个分割剂量照射小鼠,则经rSCF最佳方案治疗的300多只小鼠100%存活。

照后头8天内,rSCF和对照组的外周血液学检测无显著差异,第10天时,rSCF组小鼠的WBC呈小的不稳定增长,在14~21天期间,WBC快速升高。照后头10天内未见两组的RBC值有明显差别,之后对照组RBC值突然下降,rSCF组在照后21天恢复到照前水平。血球容积变化与RBC的一样。照后3天,血小板(pl)值很快下降,对照组小鼠的pl持续下降;在第10天,5只小鼠中的4只其pl值<2万/ml,第5只小鼠的pl仅有2.9万/ml。相反,rSCF组的pl从不低于5万/ml,最低点在照后第八天,21天时增殖至6万/ml,第10天pl值为对照组的6倍。

照后第3天,骨髓细胞数约是照前的4%。对照组的骨髓细胞数未恢复,rSCF组的骨髓细胞数在第6天时急剧增加,21天时几乎恢复到照前水平。还发现GM-CFC和HPP-CFC在照射后减少,照后1天时,HPP-CFC及GM-CFC减至照前的1%以下。对照组的HPP-CFC及GM-CFC值一直低于照前的1%,直至死亡。对比之下,rSCF组小鼠的HPP-CFC和GM-CFC数目在照后第6天分别高于对照组的100倍和28倍。21天时,GM-CFC值恢复正常,而较幼稚的HPP-CFC仅恢复到照前的50%。

骨髓细胞的细胞自旋标本证明,对照组的嗜中性粒细胞祖细胞和成熟粒细胞明显下降

(第8天时只有照前的0.5%),而rSCF组嗜中性粒细胞总数有早期下降(8天时为照前的6.8%),随后恢复至照前水平,21天时超常增高(照前的190%)。引人注目的是,8~11天时,对照组小鼠死亡,此时rSCF组的粒细胞和粒细胞原始细胞在骨髓中的总量比对照大10倍。

### 3. 用培养外周血法检测细菌

在各种条件下培养rSCF组和对照组小鼠血,以测定散播的细菌。将细菌分型与分组为或来源于肠或来源于皮肤。对照组7只小鼠每只都查到肠源性细菌,而6只rSCF组小鼠仅1只有。

### 4. 尸体检查

对照组小鼠死于细菌感染。多种细菌群落分布在肝实质、脾脏、口腔粘膜、面部皮肤和唾液腺内,有时在肾动脉分枝中查到细菌栓子。细菌团块周围的实质细胞有退行性变,却没有细胞外炎症变化。两组小鼠的腹腔、胸腔淋巴结,脾及小肠粘膜下淋巴结中的淋巴细胞已空竭。

小肠粘膜的变化是变钝、变短,偶而有小肠绒毛尖表面坏死。肠腺有丝分裂活跃。盲肠和大肠的菌丛和粘膜形态不明显。无穿孔或腹膜炎的证据。用定性方法研究两组小鼠的小肠和大肠,未发现两组间有持续的差别。

### 5. 血清化学

用全血清分析尿素、氮、 $K^+$ 、葡萄糖、白蛋白、总蛋白和肌酐值。对照组和rSCF组之间的白蛋白及糖的数值有明显差别,其它参数无明显差别。血清化学值提示未能解释两组存活率差异的主要器官衰竭。

## 讨 论

实验研究清楚地证明,rSCF对小鼠有明显的辐射防护作用。曾有报道,淋巴和造血系统的损伤是受照动物败血症及死亡的基本原因,rSCF的显著效应是减少了动物感染的频率,这是由于其使动物的造血系统迅速恢复。幼稚的

HPP-CFC和成熟的GM-CFC原始细胞数,以及骨髓细胞数第6天时显著高于对照组。培养照后2周死亡的对照组小鼠血,证明是肠源性败血症。

照射前后注射rSCF产生最佳防护效应提示,rSCF不但保护造血细胞免遭早期辐射损伤,而且也刺激照后造血恢复,它的作用与IL-1类似。IL-1可加快骨髓细胞进入抗性最强的S期。我们认为SCF以同样的方式使辐射防护细胞同步增殖,因此形成抗辐射较强的细胞群体。rSCF在照前20小时注射有防护效果,而照前2小时注射则无效,这些事实支持细胞同步进入S期的假说是辐射防护作用的可能机制。照后这些细胞使骨髓细胞再生,随后造血得到恢复。这个现象很重要:对照组小鼠的造血在照后8~10天没有一点恢复,而rSCF组在照后5天骨髓即有明显的增生。虽然rSCF增加存活率使肠源性败血症得到预防,但在照后8~10天大多数对照组小鼠濒临死亡时,治疗组外周血中性粒细胞绝对计数无显著差别,rSCF增加抗感染能力的另一因素可能是组织肥大细胞得到辐射防护,rSCF是肥大细胞强有力的增殖信号。虽然外周血中粒细胞数无差异,但rSCF组小鼠骨髓中性粒细胞和中性粒细胞组细胞值比对照组高10倍,这可能是由于中性粒细胞在骨髓一旦生成就很快迁移到组织中,以对抗由辐射损伤引起的严重感染。

引人注意的是,Sl位点(SCF结构基因)突变的小鼠对射线敏感,Sl突变的动物 $LD_{100}$ 为2Gy。相反,它们同系未变异小鼠的 $LD_{100}$ 是7~9Gy,提示缺乏SCF可提高放射敏感性。

在这个报告中,rSCF的作用提示对放射敏感的肿瘤,如未移植骨髓支持的淋巴瘤,提高照射剂量是可行的。

[Proc Natl Acad Sci USA 1992;89:9464~9468, 马云坤节译 郭 鹤 杨凤桐校]