

造血干细胞移植辐射预处理 生物标志物的实验研究

杨晶 胡莉钧 徐军 杨淑琴

【摘要】 目的 研究小鼠受 ^{60}Co γ 射线照射后血液和免疫系统的早期生物参数变化,为造血干细胞移植(HSCT)受者放疗预处理寻找灵敏可靠的生物剂量标志物。方法 采用纯品系 BALB/c 雄性小鼠,随机分为 1 个对照组和 3 个照射组。应用 ^{60}Co γ 射线全身照射,吸收剂量分别为 0、2、4 和 6 Gy。照射后 24 h,外周血白细胞计数及淋巴细胞百分率应用血常规计数测定;外周血和骨髓嗜多染红细胞微核(mn-PCE)应用 Giemsa 染色镜下计数观察;骨髓细胞、脾脏和胸腺早期凋亡率应用 Annexin V/PI 双染法流式细胞仪检测。结果 与对照组比较,各照射组小鼠外周血白细胞计数及淋巴细胞百分率随辐射剂量增加而显著降低($P < 0.01$),其回归方程分别为 $E=0.1750D^2-1.7440D+5.2020$ 和 $E=84.9390-3.4255D$;外周血和骨髓 mn-PCE 随辐射剂量增加而显著增加($P < 0.01$),骨髓 mn-PCE 与辐射剂量呈正相关,其回归方程为 $E=3.9725D+2.9700$;骨髓细胞、脾脏和胸腺早期凋亡率随辐射剂量增加而显著增高($P < 0.01$),呈线性正相关,回归方程分别为 $E=3.42D+8.36$, $E=3.0645D+3.1840$ 和 $E=2.5620D+2.5090$ 。结论 外周血淋巴细胞计数和骨髓嗜多染红细胞微核率与辐射剂量呈线性相关,其回归方程可作为放疗预处理剂量评估灵敏可靠的早期生物剂量标志物;骨髓细胞、脾脏和胸腺淋巴细胞早期凋亡率与辐射剂量呈线性正相关,其回归方程可用于 HSCT 受者放疗预处理免疫系统抑制程度的判定指标。

【关键词】 造血干细胞移植; 辐射预处理; 细胞凋亡; 微核

Study of biological markers for radiation pretreatment of hematopoietic stem cell transplant recipients Yang Jing, Hu Lijun, Xu Jun, Yang Shuqin. Suzhou City Center Blood Bank, School of Radiation Medicine and Protection, Medical College of Soochow University, Suzhou 215006, China
Corresponding author: Yang Shuqin, Email: fd@suda.edu.cn

【Abstract】 Objective To study the early biological parameter changes of blood and immune systems of mice after ^{60}Co γ -ray irradiation in order to find sensitive and reliable biological dose markers for radiation pretreatment of hematopoietic stem cell transplant recipients. **Methods** Pure strain BALB/c male mice were randomly divided into control group and three irradiation groups and absorbed doses of total body irradiation by ^{60}Co γ -ray were 0, 2, 4, 6 Gy, respectively. In 24h after irradiation, WBC counts and lymphocyte percentages of peripheral blood were determined by blood cell counting; polychromatic erythrocyte micronucleus (mn-PCE) of peripheral blood and bone marrow were observed by microscope after Giemsa staining; apoptosis rates of bone marrow, spleen, thymus cells were assayed by flow cytometry using Annexin V and PI double staining. **Results** Compared with the control group, WBC counts and lymphocyte percentages of peripheral blood in the irradiated groups significantly decreased with the increase of radiation doses ($P < 0.01$), and their regression equations were $E=0.1750D^2-1.7440D+5.2020$ and $E=84.9390-3.4255D$ respectively. The mn-PCE of peripheral blood and bone marrow in the irradiated groups significantly increased with the increase of radiation doses ($P < 0.01$), bone marrow mn-PCE was positively correlated with the radiation dose with regression equation as $E=3.9725D+2.9700$. The early apoptosis rates of bone marrow cells, spleen and thymus cells significantly increased with the increase of radiation doses ($P < 0.01$), which were positively correlated with radiation doses, and their regression equations were $E=3.42D+8.36$, $E=3.0645D+3.1840$ and $E=2.5620D+2.5090$ respectively. **Conclusions** Peripheral blood lymphocyte count and bone marrow mn-PCE rate were linearly correlated

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.08.004

基金项目:国家自然科学基金(81372922)

作者单位:215006 苏州市中心血站(杨晶、徐军);苏州大学医学部放射医学与防护学院(杨淑琴、胡莉钧)

通信作者:杨淑琴,Email:fd@suda.edu.cn

to radiation doses, which could be used as sensitive and reliable early biological markers of the radiation pretreatment recipients, and the doses of the radiation pretreatment recipients could be accurately judged according to their regression equations. The early apoptosis rates of bone marrow, spleen and thymus cells were positive linear correlation with the radiation doses, and their regression equations could be used to judge the degree of inhibition of the immune system for radiation pretreatment recipients.

【Key words】 Hematopoietic stem cell transplantation; Radiation pretreatment; Apoptosis; Micronucleus

全身照射(TBI)是造血干细胞移植(HSCT)受者预处理的重要手段^[1-2]。放射预处理准确的个性化照射剂量方案,单纯依靠物理剂量难以实现,必须应用灵敏可靠的生物剂量计观察和确定辐射剂量。外周血淋巴细胞染色体畸变和微核是目前国际公认的辐射生物剂量计,但由于其检测周期长、方法不统一、适用的辐射剂量范围小而不适合早期辐射剂量评价^[3-5]。其他方法尚未得到临床应用。因此,辐射早期生物标志物的研究倍受血液和放疗等领域学者的关注^[6]。我们研究了不同剂量受照小鼠白细胞和淋巴细胞计数、嗜多染红细胞微核(mn-PCE)以及免疫细胞早期凋亡率的变化,旨在为HCST患者放射预处理寻找理想可靠的生物剂量标志物。

材料和方法

1. 实验动物:采用SPF级纯品系BALB/c雄性小鼠,6周龄,体重(18±2)g,由苏州大学医学部实验动物中心提供。动物随机分为对照组,2.0、4.0和6.0 Gy剂量照射组4组,每组5只小鼠。

2. 主要试剂及仪器:Annexin V/PI凋亡试剂盒(美国Introvogen公司产品),流式细胞仪(美国贝克曼公司产品)。

3. 照射条件:采用苏州大学医学部辐照中心⁶⁰Co源 γ 射线,吸收剂量率为1.0 Gy/min,小鼠一次性全身照射,吸收剂量分别为0、2.0、4.0和6.0 Gy。小鼠照射后24 h取样检测。

4. 外周血白细胞计数和分类:固定专人操作,小鼠眼球取血,EDTA-K₂抗凝,每只小鼠取血0.5 ml,取2%乙酸180 μ l于EP管中,加入抗凝血20 μ l,稀释20倍,混匀放置5 min,常规白细胞计数。常规血涂片,瑞氏染色,计数500个白细胞进行分类。

5. 脾和胸腺淋巴细胞悬液的制备:小鼠照射后24 h颈椎脱臼处死,无菌分离脾脏和胸腺,分别放在含有2 ml PBS缓冲液(pH 7.2)的培养皿中,用眼科弯镊轻轻刮脾脏和胸腺,使其成为单细胞悬液,将细胞悬液吸入10 ml离心管中,1 500 r/min离心

10 min(离心半径14 cm),弃去上清液,加入Tris-NH₄Cl(pH 7.2)去除红细胞,离心,PBS洗2次,调整细胞密度为2×10⁶/ml。

6. 骨髓细胞悬液的制备:小鼠照射后24 h处死,迅速取下两侧股骨,剔除肌肉,剪去两端骨髓,用注射器吸取PBS从股骨上端开口处冲洗骨髓腔,冲洗物从股骨下端开口处流入EP管中,应用微型离心机,1 500 r/min离心10 min(离心半径10 cm),弃去上清,取部分沉淀物混合小牛血清进行骨髓涂片,余下的沉淀物加入Tris-NH₄Cl(pH 7.2)去除红细胞,离心,PBS洗2次,调整细胞密度为2×10⁶/ml。

7. 外周血和骨髓嗜多染细胞微核(mn-PCE)检测:小鼠处死前从尾静脉取血制备血涂片,骨髓细胞悬液制备过程中离心后骨髓涂片,待血涂片和骨髓涂片自然干燥后,甲醇固定10 min,Giemsa染色,嗜多染红细胞呈灰蓝色,成熟红细胞呈粉红色。典型的微核多为单个、圆形、边缘光滑整齐,嗜色性与核质一致,呈紫红色或蓝紫色,直径通常为红细胞的1/20~1/5。选择细胞分散、形态完整、染色良好、背景清晰的细胞在油镜下观察并统计,每只小鼠观察1 000个嗜多染红细胞,计数微核细胞率(%)。

8. 流式细胞术(FCM)检测:将上述细胞悬液离心去上清,用Annexin V-binding缓冲液调整细胞密度为1×10⁶/ml,取100 μ l细胞悬液,加入Annexin V 5 μ l和100 μ g/ml的PI 1 μ l,室温放置15 min,再加入Annexin V-binding缓冲液400 μ l,冰上混合立即应用流式细胞仪检测。

9. 统计学处理:检测结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,用SAS统计软件进行组间方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

1. 受照小鼠外周血白细胞和淋巴细胞计数的变化:经不同剂量⁶⁰Co γ 射线照射对小鼠外周血白细胞计数及淋巴细胞百分率的影响见表1。

由表1可见,应用⁶⁰Co γ 射线对小鼠进行不同剂量辐射,照射后24 h外周血白细胞计数及淋巴细胞

表 1 不同剂量照射后 24 h 小鼠外周血白细胞和淋巴细胞计数的变化($\bar{x}\pm s$)

辐射剂量 (Gy)	鼠数	白细胞计数 ($\times 10^9/L$)	淋巴细胞百分率 (%)
0	5	5.28±0.27	84.83±2.27
2	5	2.18±0.29 ^a	77.22±1.15 ^a
4	5	1.26±0.28 ^{ab}	73.30±3.14 ^{ab}
6	5	0.96±0.32 ^{ab}	63.30±2.17 ^{abc}

注: a: 与对照组比较, $P < 0.01$; b: 与 2 Gy 照射组比较, $P < 0.01$; c: 与 4 Gy 照射组比较, $P < 0.01$

百分率显著降低, 与对照组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.01$); 各照射组间淋巴细胞百分率差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。

将表 1 数据拟合回归方程, 受照小鼠外周血白细胞计数随着辐射剂量的增加而降低, 回归方程为线性平方模型: $E = 0.1750D^2 - 1.7440D + 5.2020$, 相关系数极佳 ($R = 0.9948, R^2 = 0.9896$)。小鼠淋巴细胞百分率随着辐射剂量的增加而呈线性降低, 回归方程为线性模型: $E = 84.9390 - 3.4255D$, 相关系数极佳 ($R = 0.9870, R^2 = 0.9743$)。

2. 受照射小鼠外周血及骨髓嗜多染红细胞微核的变化: 不同辐射剂量 ^{60}Co γ 射线照射对小鼠外周血及骨髓嗜多染红细胞微核率的影响见表 2。

表 2 不同剂量照射后 24 h 小鼠外周血和骨髓 mn-PCE 的变化 ($\bar{x}\pm s$)

辐射剂量 (Gy)	鼠数	外周血 mn-PCE (%)	骨髓 mn-PCE (%)
0	5	2.40±0.55	3.00±0.71
2	5	7.40±1.14 ^a	10.80±1.92 ^a
4	5	14.00±4.42 ^{ab}	19.00±2.24 ^{ab}
6	5	6.00±1.83 ^{abc}	26.75±1.26 ^{abc}

注: a: 与对照组比较, $P < 0.01$; b: 与 2 Gy 照射组比较, $P < 0.01$; c: 与 4 Gy 照射组比较, $P < 0.01$

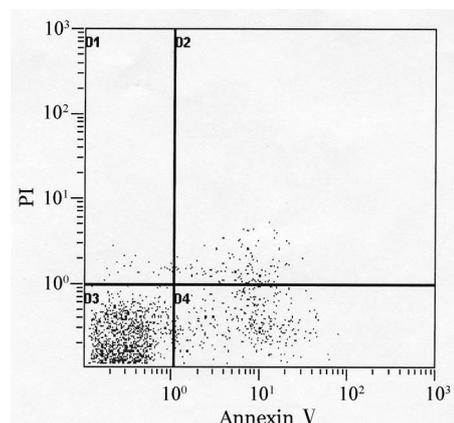
由表 2 可见, 照射组小鼠外周血 mn-PCE 随辐射剂量增加而增加, 但 6 Gy 照射组 mn-PCE 未见成比例增加, 与对照组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.01$); 骨髓 mn-PCE 随辐射剂量增加而增加, 与辐射剂量呈正相关, 与对照组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.01$), 并且各照射组间差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。

小鼠骨髓嗜多染红细胞微核率随着辐射剂量的增加而增加, 该结果拟合为线性回归方程: $E = 3.9725D + 2.9700$, 相关系数极佳 ($R = 0.9999, R^2 = 0.9999$)。

3. 受照小鼠脾脏、胸腺和骨髓细胞早期凋亡率

的变化: 细胞早期凋亡在流式细胞仪检测的细胞凋亡图谱主要位于右下象限(图 1)。

^{60}Co γ 射线不同辐射剂量照射后 24 h, 小鼠脾脏、胸腺及骨髓细胞早期凋亡率的变化见表 3。



注: 左下象限为活细胞, 右下象限为早期凋亡细胞, 右上象限为晚期凋亡细胞和坏死细胞

图 1 流式细胞术检测 4 Gy 照射小鼠骨髓细胞凋亡图谱

表 3 不同剂量照射后 24 h 小鼠脾、胸腺及骨髓细胞早期凋亡率的变化($\bar{x}\pm s$)

辐射剂量 (Gy)	鼠数	脾细胞 凋亡率 (%)	胸腺细胞 凋亡率 (%)	骨髓细胞 凋亡率 (%)
0	5	3.90±1.33	1.95±0.76	8.72±2.33
2	5	8.86±0.32 ^a	8.91±1.16 ^a	14.48±3.17 ^a
4	5	14.20±0.72 ^{ab}	11.88±0.78 ^{ab}	22.40±2.66 ^{ab}
6	5	22.55±1.39 ^{abc}	18.04±3.71 ^{abc}	

注: a: 与对照组比较, $P < 0.01$; b: 与 2 Gy 照射组比较, $P < 0.01$; c: 与 4 Gy 照射组比较, $P < 0.01$

由表 3 可见, 与对照组比较, 照射组小鼠脾脏、胸腺及骨髓细胞早期凋亡率随放射剂量增加而增加, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$), 剂量效应呈正相关, 并且各照射组间差异亦具有统计学意义 ($P < 0.01$), 6 Gy 照射组小鼠因骨髓细胞量太少而无法进行凋亡检测。

小鼠脾细胞、胸腺细胞和骨髓细胞凋亡率随着辐射剂量的增加而增加, 剂量效应呈正相关, 拟合为线性回归方程, 其中脾细胞凋亡率为 $E = 3.0645D + 3.1840$, 相关系数极佳 ($R = 0.9915, R^2 = 0.9832$); 胸腺细胞凋亡率为 $E = 2.5620D + 2.5090$, 相关系数极佳 ($R = 0.9897, R^2 = 0.9796$); 骨髓细胞凋亡率为 $E = 3.42D + 8.36$, 相关系数极佳 ($R = 0.9959, R^2 = 0.9918$)。

讨 论

HCST 患者放射预处理吸收剂量的评估十分重要, 这有赖于灵敏、可靠、简便的生物剂量^[7]。本研

究我们对放射预处理的早期生物学标志物进行了研究。

淋巴细胞是辐射早期最敏感的细胞之一。本研究结果显示,⁶⁰Co γ射线照后24 h,小鼠外周血白细胞计数及淋巴细胞百分率显著降低,尤其淋巴细胞百分率与辐射剂量呈线性负相关,其回归方程为 $E=84.9390-3.4255D$,相关系数极佳,与国外研究发现淋巴细胞的辐射敏感性是一致的^[8]。因此,我们可通过检测患者外周血淋巴细胞百分率应用该方程判断放射预处理的吸收剂量。外周血取材方便、检测迅速,适用于进行连续动态观察。

微核试验(micronucleus, MN)是检测辐射或化学诱变剂的诱发DNA和染色体损伤的一个敏感生物学指标^[5]。1982年Schlegel等^[9]首次证实了化学诱变剂引起的外周血红细胞微核的存在。1993年Chaubey等^[10]首次发现⁶⁰Co γ射线引起小鼠微核嗜多染红细胞(mn-PCE)从骨髓向血液的迁移规律,外周血mn-PCE在照射后12 h与骨髓mn-PCE比率相同,在照射后36 h达峰值。杨占山等^[11]进一步研究了¹⁴⁷Pm内污染诱发小鼠嗜多染红细胞微核的适应性反应。在上述国内外研究基础上,本研究结果表明,小鼠受到2.0~4.0 Gy γ射线照射后24 h,外周血mn-PCE发生率随辐射剂量增加而增加,与剂量呈正相关;但6.0 Gy照射组外周血mn-PCE微核发生率反而降低,可能是由于骨髓细胞增生受抑制,mn-PCE由骨髓释放到外周血减少所致。骨髓mn-PCE随辐射剂量增加而增加,与辐射剂量呈极佳的线性正相关,回归方程为线性方程 $E=3.9725D+2.9700$,因此,通过检测骨髓mn-PCE,应用该方程可准确评估HCST放射预处理受者吸收剂量,与上述外周血淋巴细胞计数相互印证,是具有临床意义的辐射剂量生物标志物。

放射预处理的主要目的之一是抑制干细胞移植受者的免疫细胞。辐射细胞凋亡是引起细胞死亡的主要机制之一^[12]。有研究发现,不同剂量γ射线照射小鼠,其外周血、胸腺、脾脏和淋巴结淋巴细胞和骨髓细胞大量凋亡,与辐射剂量呈正相关。为了对辐射免疫抑制进行个性化评价^[13],本实验中我们则对辐射引起的淋巴细胞及骨髓细胞的早期凋亡进行了研究。结果显示,小鼠受到2.0~6.0 Gy γ射线照射后24 h,脾细胞、胸腺细胞和骨髓细胞早期凋亡率随辐射剂量的增加而增高,剂量效应呈极佳的线性正相关,其回归方程脾细胞为 $E=3.0645D+3.1840$,胸腺细胞为 $E=2.5620D+2.5090$,骨髓细胞为

$E=3.42D+8.36$ 。表明放射预处理诱发细胞凋亡是导致淋巴细胞迅速减少、中枢和外周免疫功能抑制的重要原因。全身照射所致脾细胞、胸腺淋巴细胞和骨髓细胞早期凋亡率线性回归方程具有一致性,为辐射剂量个性化评价和判断放射预处理免疫抑制程度提供了实验依据。

参考文献

- [1] Kim I, Park S, Kim BK, et al. Allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: a retrospective study of busulfan-cytosin versus total body irradiation-cytosin as preparative regimen in Koreans[J]. Clin Transplant, 2001, 15(3): 167-172.
- [2] Nakasone H, Fukuda T, Kanda J, et al. Impact of conditioning intensity and TBI on acute GVHD after hematopoietic cell transplantation[J]. Bone Marrow Transplant, 2015, 50(4):559-565
- [3] Ryabchenko N. Radiation-induced chromosomal instability of human lymphocytes as a marker of breast cancer risk[J]. Probl Radiac Med Radiobiol, 2014, 19:450-457.
- [4] Miron SD, Astărăstoae V. Long-term biological effects induced by ionizing radiation-- implications for dose mediated risk[J]. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi, 2014, 118(3):717-723.
- [5] Tamizh Selvan G, Chaudhury NK, Venkatachalam P. Comparison of results of the manual and automated scoring of micronucleus frequencies in (⁶⁰Co)-irradiated peripheral blood lymphocytes for triage dosimetry[J]. Appl Radiat Isot, 2015, 97:70-77.
- [6] Caradonna F. Nucleoplasmic bridges and acrocentric chromosome associations as early markers of exposure to low levels of ionising radiation in occupationally exposed hospital workers[J]. Mutagenesis, 2015, 30(2):269-275.
- [7] Zhang SB, Yang S, Vidyasagar S, et al. PicoGreen assay of circular DNA for radiation biodosimetry[J]. Radiat Res, 2015, 183(2):188-195.
- [8] Seth I, Joiner MC, Tucker JD. Cytogenetic low-dose hyperradiosensitivity is observed in human peripheral blood lymphocytes[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2015, 91(1):82-90.
- [9] Schlegel R, MacGregor JT. The persistence of micronuclei in peripheral blood erythrocytes: detection of chronic chromosome breakage in mice[J]. Mutat Res, 1982, 104(6):367-369.
- [10] Chaubey RC, Bhilwade HN, Joshi BN, et al. Studies on the migration of micronucleated erythrocytes from bone marrow to the peripheral blood in irradiated Swiss mice[J]. Int J Radiat Biol, 1993, 63(2): 239-245.
- [11] 杨占山, 杨淑琴, 朱寿彭. ¹⁴⁷Pm内污染诱导小鼠嗜多染红细胞突变的适应性研究[J]. 工业卫生与职业病, 1999, 25(6):328-331.
- [12] Christensen DM, Livingston GK, Sugarman SL, et al. Management of ionizing radiation injuries and illnesses, Part 3: Radiobiology and health effects of ionizing radiation[J]. J Am Osteopath Assoc, 2014, 114(7): 556-565.
- [13] Terzoudi GI, Pantelias GE. Cytogenetic methods for biodosimetry and risk individualisation after exposure to ionising radiation[J]. Radiat Prot Dosimetry, 2006, 122(1-4): 513-520.

(收稿日期:2015-02-14)

(本文编辑:董文革)