

不同剂量辐射对小鼠造血干/祖细胞的慢性损伤

张晋福¹, 徐子松¹, 范汉程², 杨子豪¹, 邓榕¹, 曾俊文¹, 舒鑫¹, 曾慧红^{2,3}, 邵立健^{1,3}

1. 南昌大学公共卫生学院, 劳动卫生与环境卫生学教研室/江西省预防医学重点实验室, 江西 南昌 330006

2. 南昌大学基础医学院组织胚胎学教研室, 江西 南昌 330006

3. 南昌大学高等研究院微纳米科学与技术省重点实验室, 江西 南昌 330006

摘要:

[背景] 电离辐射(IR)引起的造血系统慢性损伤常被忽略, 该损伤的本质原因是造血干/祖细胞(HSPCs)的损害。

[目的] 探究不同辐射剂量与同一辐射剂量不同辐射方式 IR 对小鼠骨髓内 HSPCs 的长期影响, 为减少 IR 导致的造血系统慢性损伤提供科学依据。

[方法] 将 16 只 8~10 周龄雄性 C57BL/6 小鼠随机分为 4 组。各组小鼠接受不同剂量和不同方式的 X 射线全身辐射, 分别为 1.5 Gy 连续 4 次(1.5 Gy×4)辐射组($n=5$)、3 Gy 辐射组($n=4$)、6 Gy 辐射组($n=4$)和未辐射组($n=3$)。辐射后 2 个月, 收集各组小鼠骨髓细胞并计数, 通过体外克隆形成实验(CAFC)分析骨髓细胞的克隆形成能力, 通过流式细胞术分析 HSPCs 的细胞比例, 通过增殖细胞核抗原-67(Ki-67)和 7-氨基放线菌素 D(7-AAD)双染色分析 HSPCs 的细胞周期, 通过 2, 7-二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFDA)探针分析 HSPCs 的活性氧(ROS)水平, 通过 5-十二酰氨基荧光素-二-β-D-吡喃半乳糖苷(C12FDG)探针分析 HSPCs 的细胞老化情况, 通过实时荧光定量 PCR 检测 *P16*、*P19*、*P21* 和 *P27* 等老化相关基因的表达差异。

[结果] 不同剂量和不同方式辐射小鼠后 2 个月, 小鼠骨髓细胞数无明显变化(均 $P>0.05$); 3 Gy 和 6 Gy 辐射后骨髓细胞的体外克隆形成能力较未辐射组下降($P<0.01$); HSPCs 对不同辐射剂量和辐射方式的反应不一致。总体来看, 与未辐射组相比, 辐射后长时程造血干细胞(LT-HSCs)细胞比例无明显变化($P>0.05$), 造血祖细胞(HPCs)、造血干细胞(HSCs)、短时程造血干细胞(ST-HSCs)和多能造血祖细胞群 2(MPP2)细胞比例升高(均 $P<0.05$), LSK、MPP1、MPP3 和 MPP4 细胞比例降低(均 $P<0.05$); 除了 HPCs 和 MPP2 外, HSPCs 的 G0 期比例减少(均 $P<0.05$); 单次 6 Gy 辐射后 HSPCs 的 ROS 明显增加(均 $P<0.05$), 3 Gy 和 1.5 Gy×4 辐射后的 ROS 与未辐射组水平无差异(均 $P>0.05$); HPCs、LSK 和 HSCs 细胞经辐射暴露后老化细胞比例均增加(均 $P<0.05$), 且 1.5 Gy×4 和 6 Gy 辐射后 HSCs 内 *P16*、*P19*、*P21* 和 *P27* 等老化相关基因表达量较未辐射组升高(均 $P<0.05$)。

[结论] 骨髓内 HSPCs 对不同剂量和不同方式的 IR 反应不一致。ROS 累积和细胞老化可能参与了 IR 导致的 HSPCs 损伤过程。

关键词: 电离辐射; 造血干/祖细胞; 细胞周期; 活性氧; 细胞老化

Chronic injury of hematopoietic stem and progenitor cells induced by different doses of radiation ZHANG Jinfu¹, XU Zisong¹, FAN Hancheng², YANG Zihao¹, DENG Rong¹, ZENG Junwen¹, SHU Xin¹, ZENG Huihong^{2,3}, SHAO Lijian^{1,3} (1. Department of Occupational Health and Environmental Health/Jiangxi Provincial Key Laboratory of Preventive Medicine, School of Public Health, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China; 2. Department of Histology and Embryology, School of Basic Medicine, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China; 3. Provincial Key Laboratory of Micro-Nano Science and Technology, Institute for Advanced Study, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

Abstract:

[Background] The chronic injury of the hematopoietic system caused by ionizing radiation (IR) is often ignored. The essential cause of this injury is the damage of hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs).



DOI 10.11836/JEOM21494

基金项目

国家自然科学基金(82073484, 81860026); 江西省自然科学基金(2019288G70043, 20202ACB206009); 南昌大学交叉创新基金项目(9166-27060003-YB13)

作者简介

张晋福(1996—), 男, 硕士生;
E-mail: zjf99934@163.com

通信作者

邵立健, E-mail: lshao@ncu.edu.cn

伦理审批 已获取

利益冲突 无申报

收稿日期 2021-10-17

录用日期 2022-03-20

文章编号 2095-9982(2022)07-0792-07

中图分类号 R13

文献标志码 A

►引用

张晋福, 徐子松, 范汉程, 等. 不同剂量辐射对小鼠造血干/祖细胞的慢性损伤 [J]. 环境与职业医学, 2022, 39(7): 792-798.

►本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.11836/JEOM21494

Funding

This study was funded.

Correspondence to

SHAO Lijian, E-mail: lshao@ncu.edu.cn

Ethics approval Obtained

Competing interests None declared

Received 2021-10-17

Accepted 2022-03-20

► To cite

ZHANG Jinfu, XU Zisong, FAN Hancheng, et al. Chronic injury of hematopoietic stem and progenitor cells induced by different doses of radiation[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2022, 39(7): 792-798.

► Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.11836/JEOM21494

[Objective] To explore the long-term effects of IR at different radiation doses and at different radiation fractions of the same radiation dose on HSPCs in the bone marrow of mice, and to provide a scientific basis for reducing the chronic damage to the hematopoietic system caused by IR.

[Methods] A total of 16 male C57BL/6 mice aged 8-10 weeks were randomly divided into four groups that received different doses or fractions of total body X-ray irradiation, including 1.5 Gy×4 irradiation group ($n=5$), 3 Gy irradiation group ($n=4$), 6 Gy irradiation group ($n=4$), and non-irradiation group ($n=3$). Two months after irradiation, bone marrow cells from each mouse were collected and counted. The clone forming ability of bone marrow cells was analyzed by cobblestone area-forming cell (CAFC) assay. The proportion of HSPCs was measured by flow cytometry. The cell cycle of HSPCs was assessed by antigen identified by monoclonal antibody Ki 67 (Ki-67) and 7-amino-actinomycin D (7-AAD) double staining. The reactive oxygen species (ROS) levels of HSPCs were estimated with a 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA) probe. The cellular senescence of HSPCs was evaluated with a 5-dodecanoylamino-fluorescein di- β -D-galactopyranoside (C12FDG) probe. The expression of senescence related genes such as *P16*, *P19*, *P21*, and *P27* was measured by real-time fluorescence quantitative PCR.

[Results] There was no significant change in the numbers of bone marrow cells 2 months after different doses and fractions of radiation ($P>0.05$). The clone forming ability of bone marrow cells was significantly decreased after 3 Gy and 6 Gy irradiation when compared to non-irradiated mice ($P<0.01$). HSPCs responded inconsistently to different doses and fractions of irradiation. Overall, there was no significant change in long-term hematopoietic stem cells (LT-HSCs) proportion after irradiation ($P>0.05$), the proportions of hematopoietic progenitor cells (HPCs), hematopoietic stem cells (HSCs), short-term hematopoietic stem cells (ST-HSCs), and multipotent progenitors 2 (MPP2) increased after irradiation ($P<0.05$), and the proportions of LSK, MPP1, MPP3, and MPP4 cells decreased after irradiation ($P<0.05$); except for HPCs and MPP2, the proportion of HSPCs in G0 phase was decreased ($P<0.05$). The ROS production in HSPCs was increased significantly after 6 Gy irradiation ($P<0.05$), while the ROS levels after 3 Gy and 1.5 Gy×4 irradiation were similar to that of the non-radiation group ($P>0.05$). The cellular senescent proportion of HPCs, LSK, and HSCs increased after irradiation ($P<0.05$). The expression levels of senescence related genes *P16*, *P19*, and *P21* in HSCs were significantly increased ($P<0.05$).

[Conclusion] The responses of HSPCs in bone marrow to IR vary depending on doses and fractions of irradiation. Increased ROS production and cellular senescence may be involved in the damage process of HSPCs under radiation settings.

Keywords: ionizing radiation; hematopoietic stem and progenitor cell; cell cycle; reactive oxygen species; cellular senescence

近年来, 电离辐射(ionizing radiation, IR)广泛应用于人们的生产生活中, 超过 50% 的癌症患者需采取放射治疗^[1]。造血系统对 IR 极为敏感, 1 Gy 照射即可对其造成损伤^[2]。骨髓是人体重要的造血组织, 存在于其中的造血干/祖细胞(hematopoietic stem and progenitor cells, HSPCs)对维持造血稳态具有关键作用。IR 引起的造血系统急性损伤主要与造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)和造血祖细胞(hematopoietic progenitor cells, HPCs)的凋亡有关^[3], 使用造血生长因子等手段可以取得较好疗效^[4]。然而, IR 所致骨髓慢性损伤通常是潜在性的, 外周血细胞计数并无明显变化, 临床上容易被忽视^[5]。深入了解骨髓内 HSPCs 的内在改变是研究 IR 对造血系统慢性损伤和防护的理论基础。

IR 导致的造血系统慢性损伤主要表现为长期骨髓抑制。当机体受到 IR 刺激时, 骨髓内处于静止的 HSCs 将会被激活, 进行自我更新、增殖和分化等生理活动, 重建多能造血祖细胞(multipotent progenitors, MPPs)和 HPCs 以维持造血平衡, 该过程将会加速消耗 HSCs 的储备^[5]; 同时, 辐射会引起衰老细胞增加, 干细胞自我更新能力下降^[6]。随着 HSPCs 数量的减少和功能的下降, 最终将导致白细胞、红细胞与血小板数量减少^[7], 引起机体免疫力下降, 感染风险上升, 放疗

预后不良等负面影响, 严重损害患者的生命质量甚至导致死亡。由于对 IR 的高敏感性, HSPCs 的受损程度与 IR 的剂量及分次照射间隔时间密切相关。有研究表明, 应用 4~7.5 Gy 的 γ 射线辐射小鼠不仅能导致骨髓急性损伤, 也可导致骨髓慢性损伤^[8-9], 能较好地模拟临床放疗过程中引起的急性和慢性造血系统损伤。

本课题组研究显示 6 Gy 剂量的 γ 射线全身照射能引起小鼠 HSPCs 细胞凋亡、细胞老化和活性氧(reactive oxygen species, ROS)累积等慢性损伤^[6, 10], 另一项研究探讨了丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)家族成员 *p38 MAPK* 的抑制剂对 6 Gy 全身照射小鼠 HSCs 慢性损伤的保护作用^[11], 但目前有关 IR 对造血系统的慢性损伤尚缺乏全面报道。本研究拟评估不同剂量和不同方式 IR 对 HSPCs 细胞数量、细胞克隆形成能力、细胞周期、ROS 水平与细胞老化等方面的影响, 探讨 IR 对造血系统的慢性损伤。

1 对象与方法

1.1 实验动物

16 只正常 C57BL/6 雄性小鼠, 8~10 周龄, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 许可证编号为

SCKK(湘)2016-0002。饲养环境每日接受光照 12 h, 温度保持在 24~26 °C, 小鼠自由饮食。动物实验方案已经南昌大学实验动物福利与伦理委员会审查通过, 审查编号: NCU-CLA-2019-318。

1.2 主要试剂和仪器

标记非特异性染色的抗小鼠 Fc γ 受体 (Fc γ receptor, Fc γ R); 标记成熟细胞的抗体: 抗小鼠 CD3 ϵ (标记 T 细胞)、抗小鼠 CD45R/B220 (标记 B 细胞)、抗小鼠 Ter119 (标记红细胞)、抗小鼠 CD11b (标记单核细胞)、抗小鼠 Ly-6G/Ly-6C (Gr-1, 标记粒细胞和巨噬细胞); 标记 HSPCs 的抗体: 链霉亲和素 (streptavidin)-异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC)、抗小鼠 Sca-1-藻红素 (phycoerythrin, PE)-花青素 7 (cyanine7, Cy7)、抗小鼠 CD117(c-Kit)-别藻蓝素 (allophycocyanin, APC)-Cy7、抗小鼠 CD150-APC、抗小鼠 CD48-太平洋蓝 (pacific blue, PB)、抗小鼠 CD34-Alex Fluor 700、抗小鼠 CD135-PE、7-氨基放线菌素 D (7-amino-actinomycin D, 7-AAD) 活性染料; 细胞周期抗体: 增殖细胞核抗原-67 (antigen identified by monoclonal antibody Ki 67, Ki-67)-FITC (Biolegend 公司, 美国), 免疫磁珠 (Invitrogen 公司, 美国)。

2, 7-二氯二氢荧光素二乙酸酯 (2, 7-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFDA) 探针 (Abcam 公司, 英国), 5-十二酰氨基荧光素二- β -D-吡喃半乳糖苷 (5-dodecanoylamino fluorescein di- β -D-galactopyranoside, C12FDG) 探针 (Molecular Probes 公司, 美国)。

生物学 X 射线辐照仪 X-RAD 225 (Precision X-ray 公司, 美国), 流式细胞仪 BD FACSVersTM (BD biosciences 公司, 美国), 流式分选仪 Aria II (BD biosciences 公司, 美国), 实时荧光定量 PCR 仪 (Bio-RAD 公司, 美国)。

1.3 动物分组与处理

16 只小鼠随机分为 4 组, 每组小鼠非麻醉状态下同时放入圆形饼笼内, 均匀接受对应剂量的 X 射线全身辐射, 辐射电压 225 kV, 电流 13.3 mA, 剂量率 1.35 Gy $\cdot$ min⁻¹, 源靶距 50 cm。小鼠分组及辐射剂量: 1.5 Gy $\times$ 4 辐射组 5 只, 1.5 Gy 辐射每天 1 次, 连续 4 d, 总剂量为 6 Gy; 3 Gy 辐射组 4 只, 3 Gy 辐射 1 次; 6 Gy 辐射组 4 只, 6 Gy 辐射 1 次; 未辐射组 3 只, 不辐射。每组小鼠每次辐射结束后放回鼠笼继续常规饲养。

各组小鼠 X 射线全身辐射后 2 个月, 经异氟烷麻

醉致死。收集双侧股骨和胫骨并去除附着肌肉, 用 2.5 mL 注射器冲出骨髓细胞并悬浮于牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA)-磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffered saline, PBS) (质量分数 0.1% 的 BSA) 中, 经 0.075 mm 孔径滤网过滤, 制成单细胞悬液。1500 r $\cdot$ min⁻¹ 4 °C 离心 5 min (离心半径 15 cm), 1 mL 红细胞裂解液重悬骨髓细胞, 并置于冰上裂解 5 min, 用 4 mL BSA-PBS 终止裂解, 然后离心重悬细胞于 BSA-PBS 中。重悬后的骨髓细胞进行细胞计数, 置于冰上保存备用。

1.4 体外克隆形成实验

体外克隆形成实验 (cobblestone area-forming cell, CAFC) 参照文献 [6] 进行。将稀释好的不同浓度 200 μ L 骨髓细胞接种于含基质细胞的 96 孔培养板内, 每周换新鲜培养液 1 次。分别于接种细胞后的第 1、2、4 和 6 周显微镜下计数具有阳性克隆的孔数, 读取的结果使用 L-Calcul 1.1 软件通过泊松分布计算每 1 $\times$ 10⁵ 个骨髓细胞形成的克隆数。

1.5 骨髓内 HSPCs 比例检测

取 2 $\times$ 10⁶ 个骨髓细胞进行以下染色: 抗 Fc γ R 抗体孵育细胞 15 min 后加入生物素标记的 CD3 ϵ 、CD45R/B220、Ter119、CD11b 和 Gr-1 等抗体。冰上避光染色 30 min, 每 5 min 混匀 1 次单细胞悬液, 使细胞与抗体充分接触。然后用 streptavidin-FITC、Sca-1-PE-Cy7、c-Kit-APC-Cy7、CD150-APC、CD48-PB、CD34-Alex Fluor 700 和 CD135-PE 等抗体孵育。染色好的细胞进行流式细胞术检测出谱系 (Lineage, Lin) 阴性细胞, 随后检测 HPCs、LSK 细胞 (即抗体染色情况为 Lin⁻Sca-1⁺c-Kit⁺ 的 HSPCs)、HSCs、长时程造血干细胞 (long-term hematopoietic stem cells, LT-HSCs)、短时程造血干细胞 (short-term hematopoietic stem cells, ST-HSCs)、多能造血祖细胞群 1 (multipotent progenitors 1, MPP1)、MPP2、MPP3 和 MPP4 等细胞比例。采用 Flow Jo 10.0 软件分析流式检测结果。

1.6 骨髓内 HSPCs 的细胞周期、ROS 和细胞老化检测

将骨髓细胞经 Histopaque 1083 淋巴细胞分离液分离出单个核细胞, 单个核细胞与纯化的 CD3 ϵ 、B220、Ter119、CD11b 和 Gr-1 等抗体孵育, 通过 IgG 磁珠分离出 Lin 阴性细胞。随后 Lin 阴性细胞经 Sca-1-PE-Cy7、c-Kit-APC-Cy7、CD150-APC、CD48-PB、CD34-Alex Fluor 700 和 CD135-PE 等抗体染色用于以下检测。

1.6.1 细胞周期测定 PBS 洗 1 次染色好的细胞, 重悬于 200 μ L 4%多聚甲醛固定液中, 4 °C, 固定 30 min。

用 PBS 洗后细胞悬于含 Ki-67-FITC 和 7-AAD 染色液中, 37°C 染色 1 h。使用流式细胞仪对 HSPCs 的细胞周期进行检测和统计。

1.6.2 ROS 水平测定 PBS 洗 1 次染色好的细胞, 重悬于 0.5 mL 含 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DCFDA 的 ROS 染色液中, 37°C 染色 30 min。使用流式细胞仪对 HSPCs 的 ROS 进行检测。ROS 水平用平均荧光强度 (mean fluorescent intensity, MFI) 表示。

1.6.3 细胞老化测定 PBS 洗 1 次染色好的细胞, 重悬于含 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 细胞老化探针 C12FDG 染色液中, 37°C 染色 30 min。使用流式细胞仪对 HSPCs 的细胞老化情况进行检测。细胞老化指标用 C12FDG 阳性细胞百分比表示。

1.7 实时荧光定量 PCR 反应

每组各取 3 只小鼠, 用流式分选仪从骨髓细胞中分选出 HSCs。加入 1 mL TransZol Up 裂解液, 混匀, 室温静置 10 min 后于每管加入 200 μL 三氯甲烷, 剧烈摇晃后室温静置 3 min, $12000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 4°C 离心 10 min (7.5 cm 离心半径)。然后吸取 200 μL 上清液, 加入 200 μL 异丙醇, 轻缓上下颠倒混匀, 室温静置 10 min 后 $12000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 4°C 离心 10 min, 去上清液, 加入 1 mL 75%乙醇, 同样条件下离心 5 min, 去上清液后干燥 5 min。加入 20 μL 无核酶水溶解 RNA, 并进行逆转录。根据实时荧光定量 PCR 反应条件, 以 *HPRT* 作为内参, 在实时荧光定量 PCR 仪上进行检测 *P16*、*P19*、*P21* 和 *P27* 等老化相关基因的表达量。结果根据公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算。

1.8 统计学分析

实验数据用均数 $\pm$ 标准差表示, 采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析。多组比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 两两组间比较采用 Dunnett-*t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

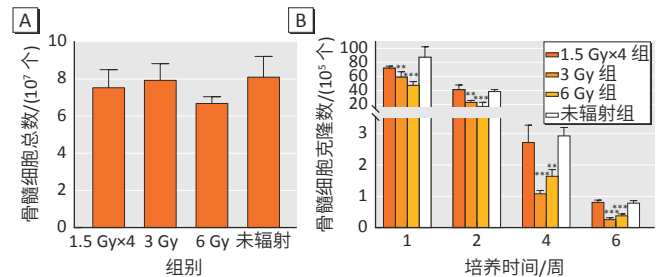
2.1 辐射后小鼠骨髓细胞数的变化

小鼠经 1.5 Gy $\times$ 4、3 Gy 和 6 Gy X 射线全身辐射 2 个月后, 骨髓内细胞数分别为 7.600×10^7 、 8.000×10^7 和 6.750×10^7 个, 与未辐射组 (8.167×10^7 个) 的差异无统计学意义 (均 $P>0.05$)。因此, 各辐射组小鼠全身辐射 2 个月后, 骨髓内的细胞数无明显变化。见图 1A。

2.2 辐射后小鼠骨髓细胞的体外克隆形成实验

各组小鼠骨髓细胞克隆数量随着培养时间逐渐下降。与未辐射组相比, 第 1、2、4 和 6 周的骨髓细胞克隆

数量在 3 Gy 辐射组分别下降了 2.827×10^6 、 1.546×10^6 、 1.850×10^5 和 5.200×10^4 个 (均 $P<0.01$), 在 6 Gy 辐射组分别下降了 4.009×10^6 、 2.192×10^6 、 1.290×10^5 和 4.000×10^4 个 (均 $P<0.01$)。1.5 Gy $\times$ 4 辐射组细胞克隆数量与未辐射组的差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见图 1B。



[注] A: 小鼠骨髓细胞数变化 ($n=3\sim 5$), B: 体外克隆形成能力变化 ($n=3$)。与未辐射组相比, **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$ 。

图 1 辐射对小鼠骨髓细胞数和体外克隆形成能力的影响 ($\bar{x}\pm s$)

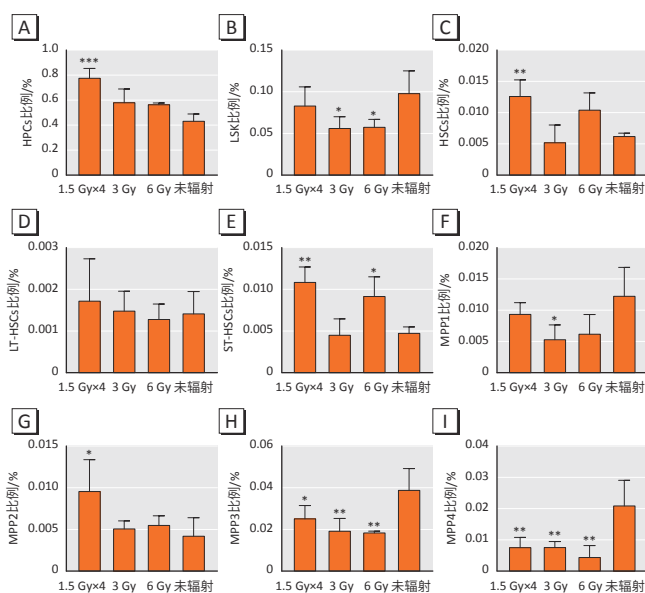
Figure 1 Effects of radiation on cell number and clone forming ability of mouse bone marrow cells *in vitro* ($\bar{x}\pm s$)

2.3 辐射后小鼠骨髓内 HSPCs 细胞比例的变化

与未辐射组相比, HPCs 比例在 1.5 Gy $\times$ 4 辐射组上升了 0.3439% ($P<0.001$); LSK 细胞比例在 3 Gy 和 6 Gy 辐射组分别下降了 0.0418% 和 0.0404% (均 $P<0.05$); HSCs 比例在 1.5 Gy $\times$ 4 辐射组上升了 0.0064% ($P<0.01$), 这主要表现在 ST-HSCs 比例的升高: ST-HSCs 比例在 1.5 Gy $\times$ 4 和 6 Gy 辐射组分别上升了 0.0061% 和 0.0045% (均 $P<0.05$), 而 LT-HSCs 比例经辐射后无改变 ($P>0.05$); 在 MPPs 细胞群中, MPP1 在 3 Gy 辐射组、MPP3 和 MPP4 在各辐射组细胞比例均下降 (均 $P<0.05$), MPP2 细胞比例在 1.5 Gy $\times$ 4 辐射组上升 ($P<0.05$)。见图 2。

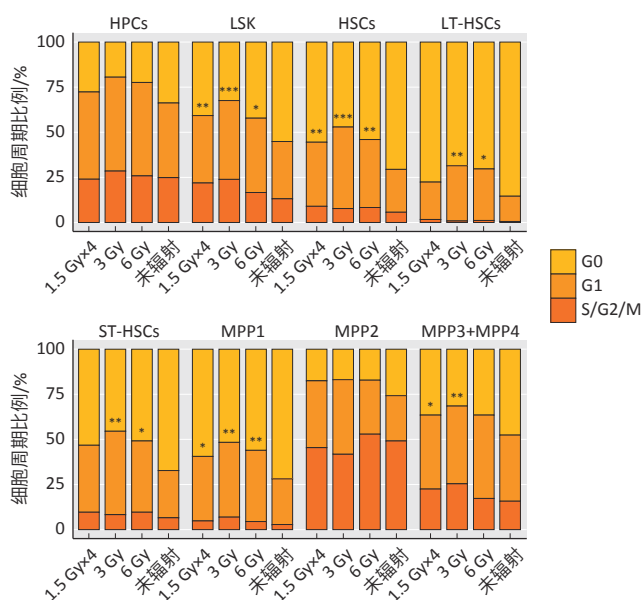
2.4 辐射后小鼠骨髓内 HSPCs 细胞周期的变化

与未辐射组相比, LSK 细胞在 1.5 Gy $\times$ 4、3 Gy 和 6 Gy 辐射组 G0 期的比例分别降低了 14.90%、22.12% 和 12.97% (均 $P<0.05$); HSCs 在 1.5 Gy $\times$ 4、3 Gy 和 6 Gy 辐射组的 G0 期比例分别降低了 14.11%、22.56% 和 15.48% (均 $P<0.01$); LT-HSCs 在 3 Gy 和 6 Gy 辐射组的 G0 期比例分别降低了 22.63% 和 15.56% (均 $P<0.05$); ST-HSCs 在 3 Gy 和 6 Gy 辐射组的 G0 期比例分别降低了 20.42% 和 14.30% (均 $P<0.05$); MPP1 在 1.5 Gy $\times$ 4、3 Gy 和 6 Gy 辐射组的 G0 期比例分别降低了 12.67%、20.15% 和 17.20% (均 $P<0.05$); MPP3 和 MPP4 在 1.5 Gy $\times$ 4 和 3 Gy 辐射组的 G0 期比例分别降低了 10.99% 和 16.33% (均 $P<0.05$); HPCs 和 MPP2 细胞周期无改变。见图 3。



[注] A: HPCs, B: LSK 细胞, C: HSCs, D: LT-HSCs, E: ST-HSCs, F: MPP1, G: MPP2, H: MPP3, I: MPP4。与未辐射组相比, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$ 。

图2 辐射对小鼠 HSPCs 比例的影响 ($n=3\sim5, \bar{x} \pm s$)
Figure 2 Effects of radiation on HSPCs proportions in mice ($n=3\sim5, \bar{x} \pm s$)



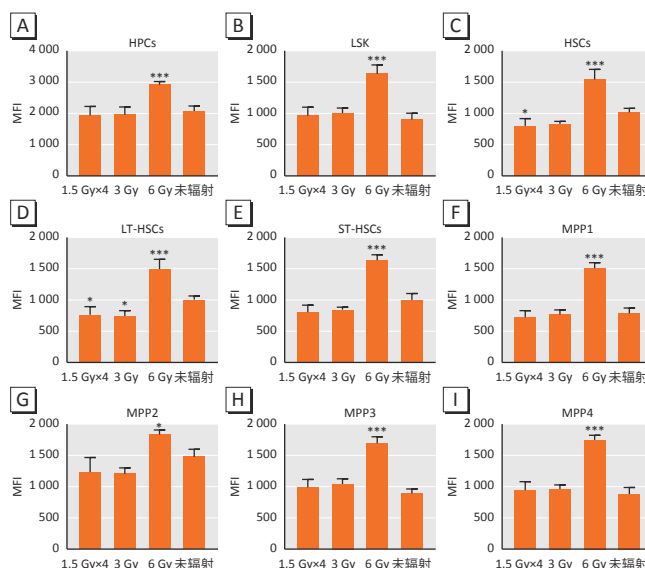
[注] 与未辐射组相比, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$ 。

图3 辐射对小鼠 HSPCs 细胞周期的影响 ($n=3\sim5, \bar{x} \pm s$)
Figure 3 Effects of radiation on HSPCs cell cycle in mice ($n=3\sim5, \bar{x} \pm s$)

2.5 辐射后小鼠 HSPCs ROS 的变化

与未辐射组相比, HSPCs 在 6 Gy 辐射组 ROS 均增加, HPCs、LSK 细胞、HSCs、LT-HSCs、ST-HSCs、MPP1、MPP2、MPP3 和 MPP4 的 ROS 在 6 Gy 辐射组 MFI 分别增加了 840.67、730.83、526.83、488.50、632.33、721.33、358.67、804.17 和 866.50 (均 $P < 0.05$)。1.5 Gyx4

和 3 Gy 辐射组绝大部分 HSPCs 的 ROS 水平与未辐射组水平相当。见图 4。

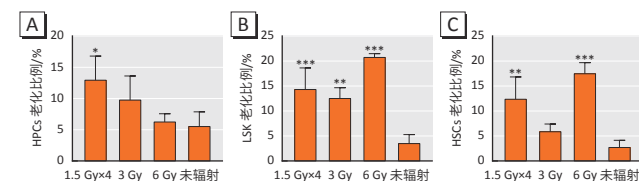


[注] A: HPCs, B: LSK, C: HSCs, D: LT-HSCs, E: ST-HSCs, F: MPP1, G: MPP2, H: MPP3, I: MPP4。MFI: 平均荧光强度。与未辐射组相比, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$ 。

图4 辐射对小鼠 HSPCs ROS 水平的影响 ($n=3\sim5, \bar{x} \pm s$)
Figure 4 Effects of radiation on ROS levels of HSPCs in mice ($n=3\sim5, \bar{x} \pm s$)

2.6 辐射后小鼠 HSPCs 细胞老化的变化

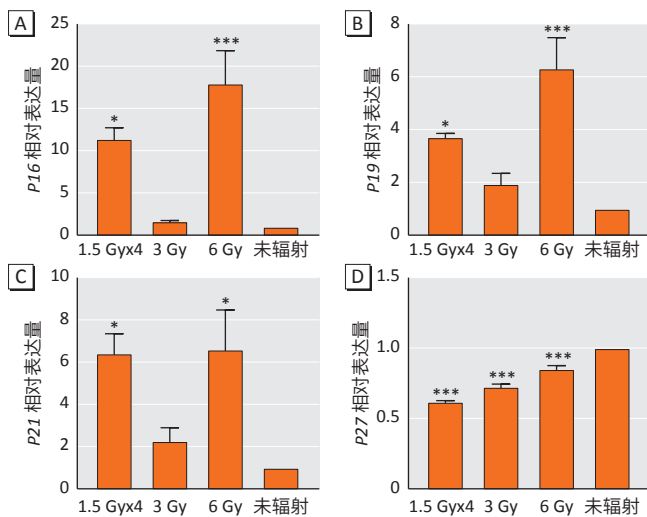
HPCs、LSK 细胞和 HSCs 经 IR 后 2 个月均有老化细胞的增多。与未辐射组相比, HPCs 在 1.5 Gyx4 辐射组细胞老化比例增加了 7.41% ($P < 0.05$); LSK 细胞在 1.5 Gyx4、3 Gy 和 6 Gy 辐射组细胞老化比例分别增加了 10.81%、9.03% 和 17.23% (均 $P < 0.01$); HSCs 在 1.5 Gyx4 和 6 Gy 辐射组细胞老化比例分别增加了 9.65% 和 14.75% (均 $P < 0.01$)。见图 5。



[注] A: HPCs, B: LSK, C: HSCs。与未辐射组相比, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$ 。

图5 辐射对小鼠 HSPCs 细胞老化的影响 ($n=3\sim5, \bar{x} \pm s$)
Figure 5 Effects of radiation on cellular senescence of HSPCs cells in mice ($n=3\sim5, \bar{x} \pm s$)

通过实时荧光定量 PCR 检测各组 HSCs 老化相关基因的表达变化, 与未辐射组相比, 1.5 Gyx4 和 6 Gy 辐射组 HSCs 内的 *P16*、*P19* 和 *P21* 表达量上调 (均 $P < 0.05$), *P27* 表达在辐射后 HSCs 内的表达量下调 ($P < 0.001$)。见图 6。



[注] A: P16, B: P19, C: P21, D: P27。与未辐射组相比, *: $P < 0.05$, ***: $P < 0.001$ 。

图6 小鼠 HSCs 老化相关基因在各组的表达变化 ($n=3, \bar{x} \pm s$)
Figure 6 Expression changes of HSCs senescence related genes in mice ($n=3, \bar{x} \pm s$)

3 讨论

外周血细胞更新周期短,维持全血细胞的稳态依赖于 HSPCs 的增殖分化。低剂量或亚致死剂量 IR 引起的造血系统慢性损伤,虽然在临床上外周血象表现正常,但骨髓内 HSPCs 却在被持续消耗^[5]。IR 可直接对机体生物大分子产生电离作用,改变分子的结构或性质,更重要的是,IR 可电离机体内水分子产生大量 ROS,导致细胞一系列氧化损伤^[3]。随着骨髓内凋亡和衰老细胞的增多,最终导致机体造血稳态失衡。因此,深入探究在不同辐射剂量和辐射方式情况下 HSPCs 的损伤情况及可能机制,对防治 IR 导致造血系统的慢性损伤具有重要意义。本研究显示,经过不同剂量和不同方式辐射后 2 个月,骨髓细胞数量变化轻微,但克隆形成能力下降显著;HSPCs 数量变化不全一致,其中尤以 MPPs 细胞群降低明显;HSPCs 的 G0 期细胞比例减少,ROS 增加,细胞老化比例升高。

IR 引起的急性骨髓抑制主要与细胞凋亡有关,而本研究显示,骨髓细胞数量在 IR 后并未出现明显减少,提示细胞凋亡并非引起长期骨髓抑制的主要方式。有研究表明,亚致死剂量全身辐射后 2 个月,LSK 细胞和 MPPs 细胞明显减少,HSCs 比例及数量相对正常^[6]。LSK 细胞是由 HSCs 和 MPPs 细胞群组成,因此 LSK 细胞的减少可主要归因于 MPPs 细胞的减少,且 LSK 细胞的减少可能是通过激活 *P53-Puma* 通路诱导的细胞凋亡而非细胞死亡^[12]。本研究得到了与之前研究相似的结果,HSCs,包括 LT-HSCs 和 ST-HSCs,以及 HPCs 的数量经辐射后 2 个月能够恢复正常,而 LSK 细胞和

MPPs 细胞群明显减少。这表明辐射后的慢性损伤对 MPPs 细胞群的数量影响较大,HSCs 的增殖分化能力下降。从体外克隆形成实验可以看出,虽然辐射后骨髓细胞的数量能够恢复,但是 HSPCs 的细胞功能却没有恢复至正常水平。由于体外克隆形成实验主要体现 HPCs 的功能,IR 后骨髓内 HSCs 的自我更新和多向分化能力还需要进一步通过骨髓移植实验来考察。

为了解骨髓内细胞功能下降的原因,本研究通过流式细胞术分析了辐射后 2 个月骨髓内 HSPCs 的细胞周期、ROS 水平和细胞老化等变化情况。细胞周期的结果显示,通常作为储备处于静止期的 HSCs 出现 G0 期比例降低的改变,提示其进入细胞周期,同样改变的还有 LSK 细胞和部分 MPPs 细胞,这可能导致 HSPCs 慢性衰退。

IR 能导致细胞内 ROS 水平升高,这可能与线粒体损伤或者还原型辅酶 II 氧化酶家族蛋白的激活有关^[13],而过量的 ROS 在骨髓造血系统损伤中发挥了重要作用^[14-16]。ROS 同时参与了 *P53-Puma*、*P16-RB* 和 *P38-MAPK* 等多条通路从而造成细胞损伤^[11, 17-20],诱导 DNA 双链断裂等 DNA 损伤^[21],降低机体 IR 损伤后的修复能力。Sim 等^[22]用 5 Gy 单一剂量照射小鼠,发现 HSPCs 内的 ROS 水平显著升高,并伴随着骨髓细胞的体外克隆形成能力和体内骨髓重建能力下降,通过应用抗氧化剂咖啡酸能显著改善照射后骨髓内造血细胞的数量和功能。Lin 等^[16]利用西罗莫司通过降低 IR 后骨髓细胞 ROS 水平及促进 DNA 损伤修复,能有效保护辐射损伤的 HSCs。本研究结果表明,6 Gy 剂量辐射能够显著升高各细胞群内的 ROS 水平,表明到达一定剂量的 IR 将导致机体无法及时清除多余的 ROS,自体修复能力有限。

ROS 的累积还与细胞老化有关,其可通过 *P53-P21*、*P38-P16* 等通路诱导 HSCs 衰老^[23-25]。衰老的 HSCs 呈现出自我更新受限^[26],分化向髓系偏移^[27],细胞周期阻滞^[28],自噬水平降低^[29],*P16*、*P19* 和 *P21* 等细胞周期调节因子积累^[30]等特征,自我重建能力受损,进而导致骨髓和外周血象不同程度的持久性损伤。Wagle 等^[15]的研究证明了 5 Gy γ 射线全身照射小鼠能导致骨髓内 HSCs 的 ROS 升高和细胞老化,阿魏酸处理照射小鼠后能显著降低 HSCs 内的 ROS 水平和老化细胞的比例,增强 HSCs 功能恢复。本研究显示,经辐射后 HPCs、LSK 细胞和 HSCs 老化的比例也明显升高,且老化相关基因的表达水平出现对应改变,进一步证实了 ROS 累积和细胞老化之间相互联系和相互影响,两者

均参与了 IR 对造血系统的长期损伤作用。近年来的研究数据表明老化 HSCs 内的细胞分裂周期因子 42 (cell division cycle 42, CDC42) 活性升高, 导致老化 HSCs 失去极性, 损伤其体内重建功能^[31]。因此可在后续实验中通过 CDC42 免疫荧光染色进一步观察不同照射条件下 HSCs 的极性变化, 来证实照射后 HSCs 的老化状态。另外, 本研究结果显示, IR 不仅能导致 HSCs 的慢性损伤, 而且存在骨髓内 MPPs 的慢性损伤。因此, 如何有效缓解 IR 导致的慢性 MPPs 损伤, 值得继续深入研究。

综上所述, 经 IR 后骨髓细胞数量能够恢复正常, 但体外克隆形成能力下降, HSPCs 细胞周期、ROS 水平和细胞老化比例均出现了较大变化, 故降低 ROS 水平和选择性清除辐射导致的老化细胞, 也许能改善辐射导致的慢性骨髓损伤。本研究较为全面地展示了不同剂量和不同方式 IR 对骨髓内 HSPCs 的影响, 为进一步探究 IR 对 HSPCs 的损伤机制和寻找有效的辐射防护手段提供了科学依据。

参考文献

- [1] HAUSSMANN J, TAMASKOVICS B, BÖLKE E, et al. Addition of chemotherapy to hyperfractionated radiotherapy in advanced head and neck cancer —a meta-analysis[J]. *Strahlenther Onkol*, 2019, 195(12): 1041-1049.
- [2] NIMKER S, SHARMA K, SARASWATHY R, et al. Delineating the effects of ionizing radiation on erythropoietic lineage —implications for radiation biodosimetry[J]. *Health Phys*, 2019, 116(5): 677-693.
- [3] RANJAN R, KALITA B, SINGH A, et al. Prophylactic administration of podophyllotoxin and rutin combination assists the revival of radiation-induced hematopoietic suppression in lethally irradiated mice[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 549: 214-220.
- [4] SINGH VK, SEED TM. Radiation countermeasures for hematopoietic acute radiation syndrome: growth factors, cytokines and beyond[J]. *Int J Radiat Biol*, 2021, 97(11): 1526-1547.
- [5] XU GS, WU HY, ZHANG JL, et al. Metformin ameliorates ionizing irradiation-induced long-term hematopoietic stem cell injury in mice[J]. *Free Radic Biol Med*, 2015, 87: 15-25.
- [6] SHAO L, FENG W, LI H, et al. Total body irradiation causes long-term mouse BM injury via induction of HSC premature senescence in an Ink4a- and Arf-independent manner[J]. *Blood*, 2014, 123(20): 3105-3115.
- [7] HÖFER T, RODEWALD HR. Differentiation-based model of hematopoietic stem cell functions and lineage pathways[J]. *Blood*, 2018, 132(11): 1106-1113.
- [8] QI Y, CHEN S, LU Y, et al. Grape seed proanthocyanidin extract ameliorates ionizing radiation-induced hematopoietic stem progenitor cell injury by regulating Foxo1 in mice[J]. *Free Radic Biol Med*, 2021, 174: 144-156.
- [9] WANG M, DONG Y, WU J, et al. Sitagliptin mitigates total body irradiation-induced hematopoietic injury in mice[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 8308616.
- [10] LI H, WANG Y, PAZHANISAMY SK, et al. Mn(III) meso-tetrakis-(N-ethylpyridinium-2-yl) porphyrin mitigates total body irradiation-induced long-term bone marrow suppression[J]. *Free Radic Biol Med*, 2011, 51(1): 30-37.
- [11] LU L, WANG YY, ZHANG JL, et al. p38 MAPK inhibitor insufficiently attenuates HSC senescence administered long-term after 6 Gy total body irradiation in mice[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(6): 905.
- [12] MENG A, WANG Y, VAN ZANT G, et al. Ionizing radiation and busulfan induce premature senescence in murine bone marrow hematopoietic cells[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(17): 5414-5419.
- [13] YANG S, LIAN G. ROS and diseases: role in metabolism and energy supply[J]. *Mol Cell Biochem*, 2020, 467(1/2): 1-12.
- [14] PAN Y, ZUO H, WEN F, et al. HMCES safeguards genome integrity and long-term self-renewal of hematopoietic stem cells during stress responses[J]. *Leukemia*, 2022, doi: 10.1038/s41375-021-01499-5.
- [15] WAGLE S, SIM HJ, BHATTARAI G, et al. Supplemental ferulic acid inhibits total body irradiation-mediated bone marrow damage, bone mass loss, stem cell senescence, and hematopoietic defect in mice by enhancing antioxidant defense systems[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10(8): 1209.
- [16] LIN Z, HOLLINGER MK, WU Z, et al. Sirolimus augments hematopoietic stem and progenitor cell regeneration following hematopoietic insults[J]. *Stem Cells*, 2021, 39(2): 240-252.
- [17] SHAO L, SUN Y, ZHANG Z, et al. Deletion of proapoptotic Puma selectively protects hematopoietic stem and progenitor cells against high-dose radiation[J]. *Blood*, 2010, 115(23): 4707-4714.
- [18] YU H, SHEN H, YUAN Y, et al. Deletion of Puma protects hematopoietic stem cells and confers long-term survival in response to high-dose γ -irradiation[J]. *Blood*, 2010, 115(17): 3472-3480.
- [19] LE ON L, RODIER F, FONTAINE F, et al. Ionizing radiation-induced long-term expression of senescence markers in mice is independent of p53 and immune status[J]. *Aging Cell*, 2010, 9(3): 398-409.
- [20] MIAO W, XUFENG R, PARK MR, et al. Hematopoietic stem cell regeneration enhanced by ectopic expression of ROS-detoxifying enzymes in transplant mice[J]. *Mol Ther*, 2013, 21(2): 423-432.
- [21] SPITZ DR, AZZAM EI, LI JJ, et al. Metabolic oxidation/reduction reactions and cellular responses to ionizing radiation: a unifying concept in stress response biology[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2004, 23(3/4): 311-322.
- [22] SIM HJ, BHATTARAI G, LEE J, et al. The long-lasting radioprotective effect of caffeic acid in mice exposed to total body irradiation by modulating reactive oxygen species generation and hematopoietic stem cell senescence-accompanied long-term residual bone marrow injury[J]. *Aging Dis*, 2019, 10(6): 1320-1327.
- [23] KIM HK, KANG MA, KIM MS, et al. Transcriptional repression of high-mobility group box 2 by p21 in radiation-induced senescence[J]. *Mol Cells*, 2018, 41(4): 362-372.
- [24] LAFARGUE A, DEGORRE C, CORRE I, et al. Ionizing radiation induces long-term senescence in endothelial cells through mitochondrial respiratory complex II dysfunction and superoxide generation[J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 108: 750-759.
- [25] IWASA H, HAN J, ISHIKAWA F. Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signalling pathway[J]. *Genes Cells*, 2003, 8(2): 131-144.
- [26] WANG Y, LIU L, PAZHANISAMY SK, et al. Total body irradiation causes residual bone marrow injury by induction of persistent oxidative stress in murine hematopoietic stem cells[J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, 48(2): 348-356.
- [27] SUDO K, EMA H, MORITA Y, et al. Age-associated characteristics of murine hematopoietic stem cells[J]. *J Exp Med*, 2000, 192(9): 1273-1280.
- [28] MOHRIN M, SHIN J, LIU Y, et al. A mitochondrial UPR-mediated metabolic checkpoint regulates hematopoietic stem cell aging[J]. *Science*, 2015, 347(6228): 1374-1377.
- [29] HO TT, WARR MR, ADELMAN ER, et al. Autophagy maintains the metabolism and function of young and old stem cells[J]. *Nature*, 2017, 543(7644): 205-210.
- [30] CHEN Z, CAO K, XIA Y, et al. Cellular senescence in ionizing radiation (Review)[J]. *Oncol Rep*, 2019, 42(3): 883-894.
- [31] FLORIAN MC, DORR K, NIEBEL A, et al. Cdc42 activity regulates hematopoietic stem cell aging and rejuvenation[J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 10(5): 520-530.

(英文编辑: 汪源; 责任编辑: 陈姣, 王晓宇)