

· 基础研究 ·

旋转磁场对放射损伤小鼠造血保护作用的研究

季百苗 宋国丽 张小云

【摘要】目的 研究旋转磁场对放射损伤小鼠的造血保护作用。**方法** C57 BL6/J 小鼠随机分为对照组和磁场组,各组小鼠分别接受致死(7.0 Gy)及亚致死(6.5 Gy)剂量¹³⁷Cs γ 射线照射,磁场组磁场处理 30 d,每天 2 次,每次 1 h,旋转磁场强度为 0.6 T。观察小鼠 30 d 的存活率和存活期;检测放射后第 7,10,14,21,28 天的外周血细胞数;测定第 12,16 天骨髓单核细胞数(BMNC)及 CFU-GM 数;观察股骨骨髓病理切片、计数血管数并检测骨形态发生蛋白(BMPs)的表达水平。**结果** 对照组和磁场组 30 d 的平均存活率分别为 10% 和 70%,平均存活期分别为(18±0.8)d 和(27±0.7)d($P<0.01$);磁场组的外周血细胞数、BMNC 数、CFU-GM 数均比对照组明显增加($P<0.05$);骨髓病理检查显示,磁场可促进骨髓造血组织结构的修复,对照组和磁场组骨髓内的血管数分别为(2.2±0.23)根和(6.4±0.53)根($P<0.01$),磁场组的骨髓 BMPs 表达水平亦明显高于对照组。**结论** 旋转磁场对放射损伤小鼠具有明显的保护作用,能促进放射损伤后造血细胞和造血微环境的修复。

【关键词】 旋转磁场; 放射损伤; 骨形态发生蛋白; 造血保护作用

The hemoprotective effects of a rotary magnetic field in mice exposed to γ irradiation Ji Bai-miao, SONG Guo-li, ZHANG Xiao-yun. Department of Biotechnology, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China

【Abstract】 Objective To study the hemoprotective effects of a rotary magnetic field (RMF) with radiation-injured mice. **Methods** C57 BL6/J mice were randomly divided into a control group and a magnetic treatment group. The mice received total body irradiation with 7.0 Gy and 6.5 Gy ¹³⁷Cs γ rays. The treatment group was treated with a RMF for one hour at a time, twice a day. The intensity of the RMF was 0.6T. The survival rate was observed for 30 days. On day 7, 10, 14, 21, 28 after irradiation, the subjects' peripheral blood cells were counted. On day 12 and 16, the number of bone marrow mononuclear cells (BMNCs) was measured and their ability to form granulocyte-macrophage colony-forming unit (CFU-GM) was assessed. The pathological sectioning of the femur was performed and the expression level of bone morphogenetic proteins (BMPs) in the bone marrow were evaluated. **Results** The RMF treatment increased the survival rate and duration among the irradiated mice and the number of blood cells in their peripheral blood. Also, RMF treatment could increase the number of BMNCs and improve their ability to form CFU-GM on days 12-16. Furthermore, RMF could improve angiogenesis and the expression level of BMPs. **Conclusion** The RMF treatment had an obvious protective effect against the effects of irradiation, and it accelerated the recovery of hematopoiesis and the hematopoietic microenvironment in mouse bone marrow.

【Key words】 Rotary magnetic field; Radiation injury; Bone morphogenetic proteins; Hemoprotection

目前,放射治疗仍是治疗肿瘤的主要手段之一。放射治疗可以大量杀死肿瘤细胞,抑制肿瘤病灶的发展,对失去手术治疗时机的晚期恶性肿瘤患者有确切疗效。但这种疗法缺乏选择性,在杀伤肿瘤细胞的同时对代谢旺盛的正常造血细胞也有杀伤作用,主要病理变化为骨髓抑制,对免疫功能和造血系统具有损伤破坏作用,引起白细胞和血小板低下,能诱发感染和出血等造血功能损伤症状^[1,2]。

研究表明,磁场可促进成骨细胞的增殖与分化,增加成骨细胞生长因子如骨形态发生蛋白(bone mor-

phogenetic proteins, BMPs)、骨碱性磷酸酶(bone-specific alkaline phosphatase, BAP)等的合成与分泌,促进成骨细胞细胞外基质的合成与分泌^[3-8]。成骨细胞是骨髓造血微环境的重要组成部分,近期有研究报道指出,成骨细胞是组成造血微环境的一个重要调节性组分^[9,10],提示磁场可能通过作用于造血微环境对造血系统发挥调节作用。本研究旨在通过旋转磁场作用于¹³⁷Cs γ 射线损伤小鼠,研究旋转磁场对放射损伤小鼠的造血保护作用,并探讨其可能的机制。

材料与方法

一、实验动物及分组

6~7 周龄、清洁级雌性 C57 BL6/J 小鼠 78 只,体

作者单位:518060 深圳,深圳大学生命科学学院深圳市微生物工程重点实验室

通讯作者:张小云

重为 (20 ± 4) g, 由中国医学科学院、中国协和医科大学天津血液学研究所实验动物中心提供。将 78 只实验小鼠随机分为正常组 (10 只)、对照组 (34 只) 及磁场组 (34 只)。对照组和磁场组的 34 只小鼠中, 10 只以 7.0 Gy γ 射线照射, 24 只以 6.5 Gy γ 射线照射, 各组小鼠均在标准条件下喂养。

二、照射条件

中国医学科学院、中国协和医科大学天津血液学研究所提供 ^{137}Cs γ 射线放射源, 采用全身一次性均匀照射。用 7.0 Gy γ 射线照射的小鼠, 观察其 30 d 的存活率和存活期; 用 6.5 Gy γ 射线照射的小鼠, 观察其外周血象等各项指标。以上照射剂量的剂量率均为 0.83 Gy/min。

三、磁场装置及处理

采用本实验室张小云教授研制的 HMF-6000 旋转磁场治疗装置 (中国专利号 ZL93118017.1, 美国发明号为 5.667.469) [5]。磁场是由稀土磁钢制成的一个圆柱形磁体, 磁场旋转频率为 10 Hz, 旋转时在磁体上方 20 cm 内形成一个直径为 60 cm 的有效半球形旋转磁场, 旋转磁场强度为 0.6 T。磁场组小鼠每天置于该装置中 2 次, 每次 1 h, 连续处理 30 d。

四、观察指标

1. 旋转磁场作用对 7.0 Gy ^{137}Cs γ 射线照射后小鼠存活率和存活期的影响: 小鼠经放射处理后, 磁场组接受磁场装置处理。每天记录小鼠死亡情况, 计算各组小鼠 30 d 的存活率和存活期。

2. 旋转磁场作用对 6.5 Gy ^{137}Cs γ 射线照射后小鼠外周血细胞的影响: 小鼠经放射处理后, 磁场组接受磁场装置处理。各组小鼠于放射后第 7, 10, 14, 21, 28 天尾静脉取血, 送中国医学科学院天津血液病医院检验科检测。

3. 旋转磁场作用对骨髓单核细胞数 (bone marrow mononuclear cells, BMNC) 及 CFU-GM 集落数的影响: 取小鼠一侧股骨, 用 IMDM 培养液 (Gibco 公司) 冲洗出骨髓细胞制成单细胞悬液, 计数 BMNC。上述单细胞悬液按 2×10^4 的细胞量接种于 24 孔培养板中, 每孔含 MethoCultTM 3434 集落培养基 (STEMCELL Technologies 公司) 0.5 ml, 置 37℃、5% CO_2 孵箱中培养, 第 7 天计数每孔的 CFU-GM 集落形成数。

4. 小鼠股骨骨髓病理切片观察: 取小鼠一侧股骨后快速放入甲醛中固定 24 h 以上, 用硝酸脱钙后进行脱水、浸蜡、石蜡包埋、切片。苏木素-伊红 (HE) 染色后在光镜下观察骨髓造血组织情况并直接计数血管数量。

5. 观察小鼠骨髓组织中 BMPs 表达水平: 小鼠股骨石蜡切片常规脱蜡至水, 微波修复抗原, 山羊血清封

闭, 加适当比例稀释的一抗 (BMPs 兔抗多克隆抗体, 武汉博士德公司), 4℃ 过夜, 加生物素化二抗 (北京中杉公司 SP-9000 通用型免疫组化试剂盒)、辣根过氧化物酶标记链霉卵白素 (S-A/HRP), DAB 染色, 苏木素复染, 脱水, 中性树脂封片, 光镜下观察 BMPs 的表达。正常组小鼠股骨切片以 PBS 代替一抗作空白对照。

以上所有实验均重复 3 次以上。

五、统计学分析

实验数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 两样本间比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义, 数据采用 SPSS 软件和 Excel 分析、作图。

结 果

一、旋转磁场对放射损伤小鼠 30d 存活率及存活期的影响

经 7.0 Gy ^{137}Cs γ 射线照射后, 对照组小鼠第 13 天开始死亡, 第 16 ~ 20 天为死亡高峰期; 磁场组小鼠第 16 天开始死亡, 第 20 天左右为死亡高峰; 磁场组小鼠存活率和存活期明显高于对照组, 照射后 30 d, 对照组和磁场组小鼠平均存活率分别为 10% 和 70%, 平均存活期分别为 (18 ± 0.8) d 和 (27 ± 0.7) d, 2 组间的差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图 1。

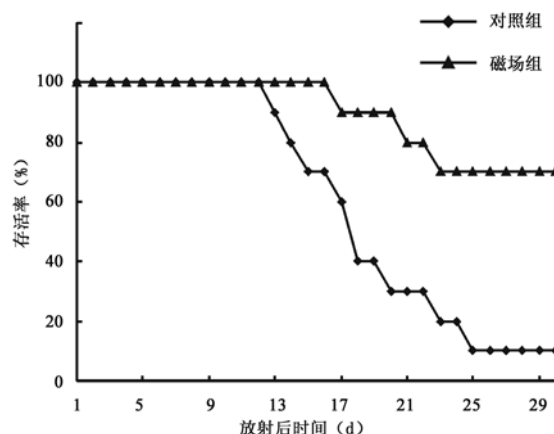


图 1 旋转磁场对放射损伤后小鼠 30 d 存活率的影响

二、旋转磁场对放射损伤小鼠外周血象的影响

经 6.5 Gy ^{137}Cs γ 射线照射后, 各组小鼠外周血白细胞、红细胞、血小板数及血红蛋白含量均大幅度下降, 至第 10 天降至最低, 随后开始逐渐恢复, 在 28 d 内磁场组小鼠血细胞的恢复均比对照组快。磁场可以提高不同时间段的血细胞数, 特别是在照射后 10 ~ 28 d, 磁场组外周血细胞数均明显高于对照组, 2 组间的差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。

三、旋转磁场对 BMNC 数及 CFU-GM 集落形成能力的影响

放射后第 12 天,对照组和磁场组单根股骨 BMNC 数分别为 $(2.10 \pm 0.47) \times 10^7$ 个和 $(2.50 \pm 0.68) \times 10^7$ 个,CFU-GM 集落形成数分别为 (0.70 ± 0.15) 个和 (33.20 ± 5.40) 个;放射后第 16 天,对照组和磁场组单根股骨 BMNC 数分别为 $(0.90 \pm 0.05) \times 10^7$ 个和 $(1.20 \pm 0.14) \times 10^7$ 个,CFU-GM 集落形成数分别为 (9.00 ± 1.04) 个和 (33.20 ± 7.59) 个。磁场组均明显高于对照组,2 组间的差异有统计学意义,见表 2。

表 1 旋转磁场对放射损伤小鼠外周血象的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	放射后 时间(d)	WBC ($\times 10^9/L$)	RBC ($\times 10^{12}/L$)	PLT ($\times 10^9/L$)	HGB (g/L)
对照组	10	7	1.30 $\pm$ 0.14	8.70 $\pm$ 0.55	522.50 $\pm$ 39.60	122.50 $\pm$ 7.07
		10	0.70 $\pm$ 0.03	5.60 $\pm$ 0.44	191.20 $\pm$ 29.00	83.70 $\pm$ 5.06
		14	1.40 $\pm$ 0.18	6.50 $\pm$ 0.78	350.00 $\pm$ 48.15	92.50 $\pm$ 10.82
		21	2.80 $\pm$ 0.12	9.10 $\pm$ 0.54	543.30 $\pm$ 51.64	131.70 $\pm$ 12.11
		28	6.70 $\pm$ 0.63	9.10 $\pm$ 0.64	160.00 $\pm$ 186.76	136.70 $\pm$ 15.05
磁场组	10	7	1.50 $\pm$ 0.14	8.30 $\pm$ 0.46	565.00 $\pm$ 35.54	122.50 $\pm$ 10.82
		10	0.90 $\pm$ 0.07	6.20 $\pm$ 0.70 *	213.70 $\pm$ 29.73	95.00 $\pm$ 10.69 *
		14	1.60 $\pm$ 0.14	7.20 $\pm$ 0.17 *	411.25 $\pm$ 36.95 *	105.00 $\pm$ 10.90 *
		21	3.30 $\pm$ 0.31 *	9.40 $\pm$ 0.90	640.00 $\pm$ 57.27 *	145.70 $\pm$ 14.72 *
		28	7.60 $\pm$ 0.67 *	9.70 $\pm$ 0.78 †	160.00 $\pm$ 101.59	136.70 $\pm$ 13.38

注:与对照组比较,* $P < 0.05$

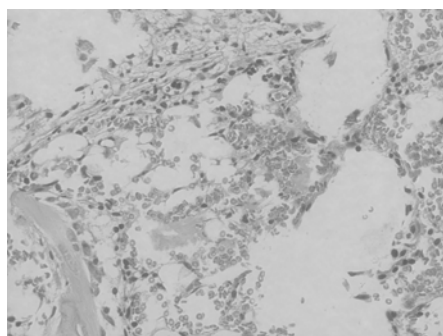
表 2 旋转磁场对放射损伤小鼠骨髓 BMNC 及 CFU-GM 集落形成数的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	放射后 时间(d)	BMNC ($\times 10^7$ 个/根股骨)	CFU-GM (个)
正常组	6		3.90 $\pm$ 0.19	52.50 $\pm$ 10.60
对照组	6	12	2.10 $\pm$ 0.47 *	0.70 $\pm$ 0.15 *
		16	0.90 $\pm$ 0.05 *	9.00 $\pm$ 1.04 *
磁场组	6	12	2.50 $\pm$ 0.68 * [#]	33.20 $\pm$ 5.40 * [△]
		16	1.20 $\pm$ 0.14 * [#]	33.20 $\pm$ 7.59 * [△]

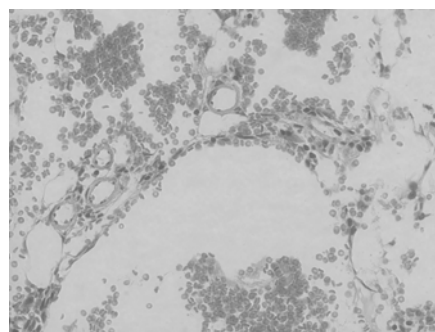
注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与对照组比较,* $P < 0.05$,[△] $P < 0.01$

四、放射损伤小鼠股骨病理切片观察

对照组出现大片空白区,造血细胞稀少,而磁场组造血组织结构较完整,造血细胞量较丰富,骨髓腔边沿都有血管,对照组血管数平均为 (2.20 ± 0.23) 根,磁场组血管数平均为 (6.40 ± 0.53) 根,磁场组小鼠的血管数量比对照组明显多,2 组间的差异有统计学意义 ($P < 0.01$),见图 2。



对照组

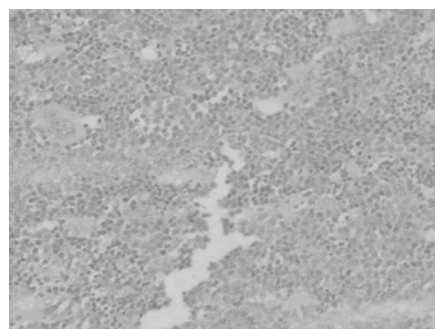


磁场组

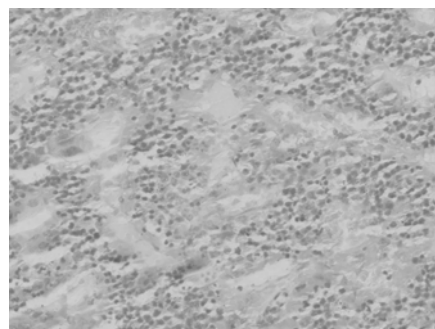
图 2 放射后第 12 天小鼠股骨病理切片观察(HE 染色, ×400)

五、放射损伤小鼠股骨 BMPs 的表达水平

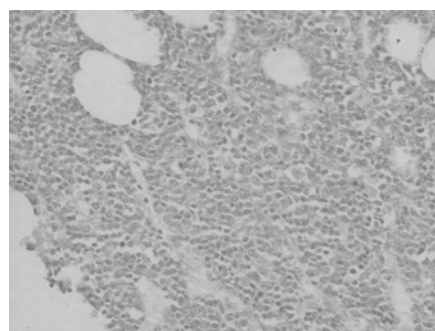
对照组和磁场组小鼠股骨中都有 BMPs 表达,旋转磁场能促进放射损伤小鼠股骨 BMPs 的表达,免疫组化切片显示磁场组 BMPs 的表达水平明显高于对照组,见图 3。



正常组



对照组



磁场组

图 3 放射后第 12 天小鼠股骨 BMPs 的表达水平(DAB 染色, ×400)

讨 论

本研究的设计是用旋转磁场作用于¹³⁷Cs γ 射线损伤小鼠,研究旋转磁场对放射损伤小鼠的保护作用以及这种作用对小鼠造血干细胞和造血微环境的影响。结果表明,旋转磁场作用能明显提高放射损伤小鼠的存活率和存活期,增加放射损伤小鼠外周血白细胞、红细胞、血小板数及血红蛋白含量,并能增加骨髓单核细胞数,提高 CFU-GM 的集落形成能力;磁场作用还明显促进放射损伤小鼠的血管生成,提高 BMPs 的表达水平。

造血干细胞是产生血液有形成分的原始细胞,具有自我更新和多向分化的能力,其增殖和分化与多种因素有关,但主要涉及造血微环境和细胞因子^[11,12]。放射可直接损伤骨髓造血微环境,从而影响对放射极为敏感的造血干细胞的修复,最终导致造血障碍。造血微环境能调节造血细胞的增殖、分化以及保留干细胞的多潜能性,骨髓造血完全依赖骨髓微环境的支持和调控,因此造血微环境在放射后造血功能恢复中起非常重要的作用^[13]。微血管系统也是造血微环境的重要组成部分,骨髓腔中的静脉血窦系统是微环境的基础,放射损伤后骨髓造血功能的恢复必须先有血管系统特别是静脉血窦的修复和血流的重建,以保证细胞生长所需的营养物质和体液因子,促进造血细胞、基质细胞的生长发育及其功能^[14]。本研究结果显示,旋转磁场能明显提高放射后第 12、16 天小鼠的骨髓单核细胞数,促进放射损伤小鼠骨髓内血管生成及造血组织的恢复,从而促进骨髓造血微环境的修复,说明旋转磁场对放射损伤后骨髓造血功能的修复具有一定的促进作用。

有研究表明,旋转磁场对生物体细胞作用的效果要比静磁场好,因为旋转的磁场穿透生物体细胞时产生切割磁力线运动,从而产生感应电流,可促进细胞内多种因子的合成与分泌^[5],这就是我们在实验中选用旋转磁场的理由。BMPs 是由成骨细胞分泌产生的,是造血微环境的一个重要组成成分,能诱导干细胞分化为成骨细胞,调节成骨细胞的生长与分化,成骨细胞的数量与 BMPs 的含量成正比。Zhang 等^[9,15]的研究表明,BMPs 可通过调节造血微环境而调控造血干细胞的数量。本研究结果表明,旋转磁场可以提高放射损伤小鼠骨髓 BMPs 的表达水平,促进造血微环境中

成骨细胞的发生与分裂。

由此我们得出结论:旋转磁场对放射损伤小鼠具有明显的保护作用,能促进放射损伤小鼠的造血修复,其作用机理可能是通过对造血干细胞和造血微环境两方面的调控而实现的。

参 考 文 献

- 1 Gandhi NM, Gopalaswamy UV, Nair CK, et al. Radiation protection by disulfiram: protection of membrane and DNA in vitro and in vivo against gamma-radiation. *J Radiat Res (Tokyo)*, 2003, 44 : 255-259.
- 2 Van der Meeren A, Mouthon MA, Vandamme M, et al. Combinations of cytokines promote survival of mice and limit acute radiation damage in concert with amelioration of vascular damage. *Radiat Res*, 2004, 161 : 549-559.
- 3 McDonald F. Effect of static magnetic fields on osteoblasts and fibroblasts in vitro. *Bioelectromagnetics*, 1993, 14 : 187-196.
- 4 Kotani H, Kawaguchi H, Shimoaka T, et al. Strong static magnetic field stimulates bone formation to a definite orientation in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res*, 2002, 17 : 1814-1821.
- 5 张宇, 张小云. 旋转磁场对去卵巢大鼠骨钙含量及其相关因子的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2004, 26 : 524-526.
- 6 汤青, 赵南明. 低频电磁场对成骨细胞增殖及细胞周期的影响. *科学通报*, 1999, 44 : 2191-2194.
- 7 赵云山, 张西正, 郭勇. 电磁场对骨组织和成骨细胞的作用. *国外医学生物医学工程分册*, 2002, 25 : 169-173.
- 8 宋晋刚, 许建中, 周强, 等. 不同频率脉冲电磁场诱导人骨髓间充质干细胞成骨分化的研究. *中华物理医学与康复杂志*, 2005, 27 : 134-137.
- 9 Zhang J, Niu C, Ye L, et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*, 2003, 425 : 836-841.
- 10 Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*, 2003, 425 : 841-846.
- 11 Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*, 1988, 241 : 58-62.
- 12 Cheng T, Rodrigues N, Shen H, et al. Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1. *Science*, 2000, 287 : 1804-1808.
- 13 高颖. 辐射对骨髓造血微环境影响的研究进展. *国外医学放射医学核医学分册*, 2000, 24 : 183-185.
- 14 刘振芳, 孙汉英, 刘文励, 等. 川芎嗪促进急性放射损伤小鼠骨髓造血修复作用的研究. *中华放射医学及防护杂志*, 2004, 24 : 396-398.
- 15 Zhang J, Li L. BMP signaling and stem cell regulation. *Dev Biol*, 2005, 284 : 1-11.

(修回日期:2006-05-15)

(本文编辑:松 明)

欢迎订阅《中华物理医学与康复杂志》