

厌氧棒状菌菌苗(77—1株)对多能干细胞的影响

卫生部药品生物制品检定所

李宇悌、董关木、李修兰、王 燕、魏 康

厌氧棒状菌是一种强有力的免疫激活剂,具有激活单核吞噬细胞系统及抑瘤活性。由骨髓中粒系定向干细胞分化而来的巨噬细胞在厌氧棒状菌苗(以下简称菌苗)实验动物抑瘤试验中起重要作用。Chare⁽¹⁾和Dimitrov⁽²⁾报道菌苗能激活小鼠骨髓定向干细胞,并提出可能对放疗,化疗造成的骨髓抑制有保护作用。为考虑菌苗与放疗的合理使用序贯,对正常小鼠照射前后注射菌苗对多能干细胞的激活作用进行了探讨。

材料和方法

1. 厌氧棒状菌苗: *7903(检定所分离的77—1菌株)福尔马林灭活,每毫升含干重2毫克菌体悬液。

2. 小鼠多能干细胞的测定:用Ti11脾结节法⁽³⁾。

(1) 试验动物: LACA小鼠22—26克,供体3~5只,受体每组10只。

(2) 照射条件: ⁶⁰Co射线全身照射剂量率150伦/分。

(3) 操作方法: 用一定量Hanks液从3~5只供体小鼠的股骨中冲出全部骨髓(脾脏用组织研磨器)计有核细胞数后,用Hank's液稀释成适当浓度的细胞悬液,给每只经致死量全身照射(800Rad)的受体小鼠尾静脉注入0.2ml,9天后取脾脏经波氏液固定后计脾脏表面生成的结节数。以脾结节生成单位表示(Colony Forming unit spleen)简称CFus。

(4) 有核细胞计数: 按常规白血球计数法。

试验结果

1. 菌苗对正常小鼠骨髓及脾脏中多能干细胞的影响: 试验组于实验前3、7、14天腹腔注射菌苗0.5mg干重/只鼠,到期后分别测定骨髓脾脏中CFus数,同时以正常未处理小鼠进行同样测定作为对照。

(1) 骨髓中的变化: 菌苗注射后第3

天骨髓中多能干细胞无论以CFus/10⁵有核细胞或CFus/根股骨计算与对照组相比均有明显增加($P < 0.01$),在第7天稍有下降,至14天又恢复至与对照组相近(表1)。

(2) 脾脏中变化: 菌苗注射后CFus变化较骨髓明显,CFus数在第3、7天与对照组相比差异显著, ($P < 0.01$)到14天时开始下降,但仍高于对照组(表2)。

表1 腹腔注射菌苗对小鼠骨髓多能干细胞的影响

注射后天数	CFus/10 ⁵ 有核细胞	P 值	CFus/根股 骨	P 值
3	21.3	<0.01	3200	<0.01
7	13.9	>0.05	1950	>0.05
14	18.8	>0.05	2300	>0.05
对 照	13		2200	

表2 腹腔注射菌苗对小鼠脾脏多能干细胞的影响

注射后天数	CFus/10 ⁵ 有核细胞	P 值	CFus/个脾	P 值
3	10	<0.05	24005	<0.01
7	9	<0.05	19010	<0.01
14	6	<0.05	14000	<0.05
对 照	4		7500	

2. 菌苗对照射小鼠多能干细胞的影响

试验1: 照射前注射菌苗的影响: 于试验前1、3、7、和14天分别腹腔注射菌苗0.5mg后经⁶⁰Co600Rad全身照射,经7天后测定骨髓及脾脏中CFus数,并以同样剂量照射而注生理盐水作为对照。骨髓中CFus/根股骨增殖速率以照射前1~3天注射菌苗作用最明显,7、14天作用逐渐减弱,1~14天每个脾脏中CFus与对照组相比均有明显增加(表3)

试验2: 照射后不同时间注射菌苗的激活作用: ⁶⁰Co600Rad照射的小鼠分别于第3小时,2、3、7天腹腔注射菌苗0.5mg,经7天后测定骨髓中CFus,用同时间同剂量照射而注生理盐水作对照。由表4看出照射后

表3 照射前不同时间注射菌苗对小鼠多能干细胞的影响

照射前注射时间 (天)	试验项目	骨				脾				脏	
		动物数	CFus/10 ⁵ 有核细胞	P值	CFus/根 股骨	P值	动物数	CFus/10 ⁵ 有核细胞	P值	CFus/个脾	P值
1		34	2.2	<0.01	162	<0.01	42	0.4	<0.05	215	<0.01
3		34	1.1	>0.05	86	<0.01	40	0.3	>0.05	126	<0.05
7		32	1.2	>0.05	56	>0.05	35	0.7	<0.01	332	<0.01
14		42	1.1	>0.05	39	>0.05	39	0.3	>0.05	211	<0.05
	对 照	36	0.8		39		36	0.3		67	

第3小时CFus增殖速率较对照组明显加快,而第2、3天注射菌苗激活作用不明显,到第7天激活作用方有一定恢复。

表4 照射后不同时间注射菌苗对小鼠骨髓多能干细胞的影响

照射后注射 时间	动物数	CFus/10 ⁵ 有核细胞	P值	CFus/根 股骨	P值
3小时	31	2.5	<0.01	153	<0.01
对 照	30	1.2		50	
2天	33	2.4	>0.05	70	>0.05
对 照	34	2.4		95	
3天	29	3.8	>0.05	149	>0.05
对 照	30	3.3		210	
7天	33	4.3	<0.01	317	>0.05
对 照	37	2.7		300	

讨 论

小鼠造血干细胞有二类:多能干细胞和定向干细胞。多能干细胞具有增殖,自我更新的能力为各类定向干细胞的祖代细胞,后者可向粒系巨噬细胞系红系分化,形成各种血液细胞。厌氧棒菌对造血干细胞的作用,近几年来,一些学者多采用体外软琼脂法及最近用³H胸腺嘧啶自杀率方法证明对粒系定向干细胞有激活作用⁽⁴⁾。Basic⁽⁵⁾等报道小鼠经600Rad照射前1、7……28天及照射后1—2小时注射菌苗,脾脏中内源性脾结节数明显增加。本试验采用脾结节法证明菌苗对正常小鼠多能干细胞具有明显激活作用,对射线损伤小鼠采用外源性脾结法与Basic获得相近结果。同时观察到菌苗注射时间对激活作用有很大关系。照射后2、3天菌苗作用不明显,可能是亚致死剂量射线损伤细胞不立即死亡,而是尚能继续分裂数次,故照

射后即时注射作用较明显。而以后由于照射效应加重抑制,了干细胞增殖,故菌苗作用表现不显著。

Dimitsov⁽⁶⁾在证明其能激活骨髓干细胞同时,提出可能对骨髓有保护作用。但也有人认为菌苗能刺激造血干细胞的增殖,同时亦增加其对周期特异性化疗药的敏感性,从而增强了对造血干细胞的毒性作用。Chare⁽¹⁾曾推测菌苗作用于对射线敏感的祖代细胞,而非作用于正常分化成熟的细胞。我们认为照射前用菌苗应在菌苗激活干细胞作用消失后即14天以上再度放射更合理,以防新生的干细胞受损。若在照射后用菌苗,如照射量大已使骨髓受损,即刻用或一周后待干细胞稍恢复后再用似更合理。临床正式用于数例以多能干细胞受损为主要病因的再生障碍贫血病人,似有一定苗头。有关这方面及其对机体免疫机能影响以及和放疗化疗药物配合时间,剂量等问题有待进一步探讨。

参 考 文 献

- (1) Chare, m, et al: Int. sym. Biol. Preparation Treatment of Cancer, London, 38: 194, 1977.
- (2) Dimitrov, N. Y. proc. soc. exp. Biol. 148: 440, 1975.
- (3) Till, J. E. Radiation Res. 14: 213, 1967.
- (4) Foster, R. S.: Cancer Res. 37: 1349, 1977.
- (5) Basic, R.H. et al: Int. sym. Biol. Preparation Treatment of Cancer, London, 38: 311, 1977.
- (6) WalmorK, N. Cancer Res. 34: 2869, 1974.