文章编号:1000-5404(2009)05-0387-04

论著

BALB/c-nu/nu 裸鼠造血微环境损伤模型的建立

高 蕾,陈幸华,张 诚,张 曦,高 力,梁 雪,龚 奕,彭贤贵,郝 磊,王庆余 (第三军医大学新桥医院血液科,重庆 400037)

摘 要:目的 构建适合移植使用的BALB/c-nu/nu裸鼠造血微环境损伤模型。**方法** 分别用3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 Gy剂量辐照BALB/c-nu/nu裸鼠,检测照射后1、3、5、7、14、21 d血象变化,检测照射后1、7、14、21 d基质细胞集落形成单位(CFU-F)和巨核细胞计数,观察照射后骨髓组织活检变化情况。**结果** 7.0 Gy辐照剂量照射后裸鼠全部死亡;6.0 Gy组照射后出现明显骨髓抑制,至照射后21 d不能恢复至照射前水平,且部分裸鼠照射后死亡;3.0、4.0 Gy照射后裸鼠仅出现轻度骨髓抑制;5.0 Gy组照射后出现明显骨髓抑制,未做特殊处理于照射后21 d自行恢复至照射前水平。不同剂量放射线照射后裸鼠CFU-F计数变化不同。3.0 Gy和4.0 Gy组CFU-F在照射后7~14 d出现轻度减少,6.0 Gy组照射后CFU-F明显减少,至照射后21 d不能恢复,5.0 Gy组照射后CFU-F也出现了较明显减少,但在照射后21 d恢复至照射前水平。**结论** 5.0 Gy是BALB/c-nu/nu裸鼠造血微环境损伤模型的适宜照射剂量。

关键词:造血微环境;照射;裸鼠;模型
中图法分类号:R-332;R551;R817 **文献标识码**:A

Establishment of hematopoietic microenviroment damage model in BALB/c-nu/nu nude mice

GAO Lei, CHEN Xing-hua, ZHANG Cheng, ZHANG Xi, GAO Li, LIANG Xue, GONG Yi, PENG Xian-gui, HAO Lei, WANG Qing-yu (Department of Hematology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To establish hematopoietic microenviroment damage model in BALB/c-nu/nu nude mice for transplant experiment. **Methods** Experimental nude mice were irradiated with 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 and 7.0 Gy ^{60}Co γ ray respectively. Then the hemogram changes were detected at 1, 3, 5, 7, 14, 21 d after irradiation, the quantity of CFU-F and megakaryocyte was counted at 1, 7, 14, 21 d after irradiation, and the biopsy of myeloid tissue was performed. **Results** Irradiated with 7.0 Gy, all nude mice died. Bone marrow of nude mice irradiated with 6.0 Gy was depressed obviously, and did not recover within 21 d, and some of them died after irradiation. Slight bone marrow depression was observed in the nude mice irradiated with 3.0 Gy and 4.0 Gy. Nude mice irradiated with 5.0 Gy showed obvious bone marrow depression, but it recoverd within 21 d. CFU-F count had slight decrease in the nude mice irradiated with 3.0 or 4.0 Gy, and remarkable decrease in the nude mice irradiated with 6.0 Gy till the 21st day after irradiation. CFU-F count also had remarkable decrease after irradiation with 5.0 Gy and recovered in 21 d after irradiation. **Conclusion** The suitable radiation dose is 5.0 Gy for creating hematopoietic microenviroment damage model in BALB/c-nu/nu nude mice.

Key words: hematopoietic microenviroment; radiation; nude mice; model

---

基金项目:国家自然科学基金(30800496,30670890);重庆市医学重点学科建设基金(2006C028);第三军医大学中青年基金(2006D140);第三军医大学新桥医院"1520人才培养工程"基金(2006~2010)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30800496, 30670890), the Funds for the Key Subjects of Medical Science of Chongqing (2006C028), the Fund for Young Distinguished Scholars by Third Military Medical University (2006D140), and the "1520 Project" of Xinqiao Hospital of Third Military Medical University (2006-2010)

作者简介:高 蕾,女,山东省掖县人,博士,主治医师,讲师,主要从事造血微环境损伤与修复方面的研究,发表论文10余篇。E-mail: gaolei7765@yahoo.com.cn
通信作者:陈幸华,E-mail: xhchen888@yahoo.com.cn

收稿日期:2008-06-26;**修回日期**:2008-07-25

造血微环境是支持、调节造血细胞生长发育的内环境,为造血干细胞的生存和发育提供不可缺少的物理支持,通过产生和分泌多种细胞因子和细胞外基质参与正常的造血调控[1,2]。随着对骨髓造血微环境结构、功能和造血调控机制研究的逐步深入,发现多种因素可导致造血微环境损伤。造血微环境中基质细胞损伤比造血实质细胞损伤导致的造血功能障碍更加持久,甚至成为永久性的造血功能障碍[3]。为了开展修复造血微环境功能促进造血功能恢复的在体研究,亟需建立合适的实验动物模型。本研究拟构建 BALB/c-nu/nu 裸鼠造血微环境损伤模型,为后续人脐血源基质细胞移植重建造血微环境,促进造血功能重建的在体研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物和主要仪器设备

1.1.1 实验动物 BALB/c-nu/nu 裸鼠,雌性,6~8 周龄,体质量 18~22 g,购自第三军医大学实验动物中心,饲养于该中心 SPF 动物饲养室。

1.1.2 主要仪器设备 SPF 级动物饲养室(第三军医大学实验动物中心),Co^{60}放射源(第三军医大学辐照中心),骨髓图文报告分析系统(重庆天海医疗设备有限公司),骨髓病理切片机(Leica,德国)。

1.2 裸鼠造血微环境损伤模型的构建

参照本室既往裸鼠放射模型的构建条件,本实验条件下设定 γ 射线单次全身照射 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 Gy 5 个剂量组,模拟轻、中、重度造血微环境功能损伤。每组 21 只裸鼠,观察辐照后裸鼠一般情况、血象变化,巨核细胞计数,骨髓基质成纤维细胞集落生成单位(colony forming unit-fibroblast,CFU-F)形成情况。记录辐照后 21d 内裸鼠死亡情况,计算存活率。

1.3 裸鼠造血微环境损伤模型血象变化情况

各辐照组裸鼠分别于照射后 1、3、5、7、10、14、21 d 尾静脉采血 20 μl 加入 0.2 ml 稀释液中,血细胞分析仪检测血小板计数。

1.4 裸鼠造血微环境损伤模型骨髓象的动态观察

各辐照组分别于照射后 1、7、14、21 d 各取裸鼠 3 只,脱颈处死,用咬骨钳和平镊剥离出双侧股骨、胫骨,用 1ml 注射器 7 号针头冲出骨髓,涂片后行瑞氏染色、骨髓象检查,计数巨核细胞数。

1.5 裸鼠造血微环境损伤模型 CFU-F 动态观察

各辐照组分别于照射后 7、14、21 d 各取裸鼠 3 只,脱颈处死,75% 酒精浸泡 5 min,用咬骨钳和平镊无菌条件下剥离双侧股骨和胫骨置入备有 10% NBS 的 IMDM 培养基中,用 1 ml 注射器 7 号针头冲出骨髓,然后依次用 7、5、4 号针头过滤成单细胞悬液,以 $1\times10^6 cm^{-2}$的细胞数接种到含有(10% FBS、10% HS 和 10^{-6}mol/L 氢化可的松)的 DMEM 培养基中,置 37℃、5% CO_2培养箱中培养。48 h 后弃去上清,每周半量换液。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 10.0 统计软件,行单因素方差分析。

2 结果

2.1 不同剂量辐照后裸鼠一般情况的变化

照射前裸鼠活动度好,进食正常,照射后 3 d 裸鼠活动减少,多蜷缩成团,进食减少。7.0 Gy 组裸鼠照射后 7~14 d 全部死亡;6.0 Gy 和 4.0 Gy 组分别死亡 4 只和 2 只裸鼠,死亡率分别为 22.2% 和 11.1%;3.0 Gy 和 5.0 Gy 组裸鼠全部存活。

2.2 不同剂量辐照后裸鼠血象的动态变化

裸鼠接受 5 个不同剂量辐照所表现出来的血象变化程度不同。3.0~6.0 Gy 组的裸鼠白细胞在照射后 3~5 d 降至最低,血红蛋白和血小板分别在照射后 7 d 和 5 d 降至最低,之后迅速恢复,4.0 Gy 组 2 只裸鼠在移植后 18 d 死亡,6.0 Gy 组 4 只裸鼠分别在照射后 6 d 和 9 d 死亡。当辐照剂量增加至 7.0 Gy 时,裸鼠造血功能不能恢复,在照射后 14 d 之内裸鼠全部死亡(表 1-3)。

表 1 不同剂量辐照后裸鼠白细胞变化($\times10^9$/L, $\bar{x}\pm s$)

剂量(Gy)	照射前	1 d	3 d	5 d	7 d	14 d	21 d
3.0	5.87±1.70	4.00±0.26	1.50±0.36^b	1.87±0.21^b	3.10±0.30^a	4.20±0.30	4.50±0.96
4.0	6.43±1.81	3.33±0.47^a	1.17±0.25^b	1.63±0.30^b	2.73±0.25^a	4.13±0.55	4.80±1.13
5.0	4.83±1.46	2.70±0.10^a	0.87±0.21^b	0.50±0.20^b	1.93±0.15^b	4.50±0.79	4.80±0.95
6.0	6.13±1.60	2.13±0.45^b	0.77±0.06^b	0.37±0.15^b	0.55±0.07^b	1.60^b	3.70^a
7.0	5.60±1.15	1.27±0.31^b	0.47±0.25^b	0.45±0.07^b	0.20^b	–	–

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, 与照射前比较

表 2 不同剂量辐照后裸鼠血红蛋白变化(g/L, $\bar{x}\pm s$)

剂量(Gy)	照射前	1 d	3 d	5 d	7 d	14 d	21 d
3.0	148.0±14.5	147.0±7.5	128.0±6.6	115.0±4.6	101.7±6.0	137.7±8.5	148.3±5.5
4.0	143.3±19.3	143.0±15.4	138.3±14.6	101.3±14.2^a	92.7±4.2^a	119.3±6.0	132.5±9.2
5.0	150.3±1.5	150.0±7.0	114.7±5.5	87.7±4.5^b	68.3±7.0^b	115.7±5.5	137.0±9.2
6.0	138.7±17.5	138.0±11.1	131.0±10.5	83.7±10.2^b	59.7±5.5^b	95.0^a	129.0
7.0	141.7±11.3	136.0±10.5	89.7±5.7^b	55.0±7.1^b	32.0^b	–	–

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, 与照射前比较

表 3　不同剂量辐照后裸鼠血小板变化($\times 10^9$/L, $\bar{x} \pm s$)

剂量(Gy)	照射前	1 d	3 d	5 d	7 d	14 d	21 d
3.0	519 ±31	588 ±14	283 ±19[a]	182 ±11[b]	269 ±24[a]	400 ±13	493 ±22
4.0	574 ±45	555 ±21	230 ±22[b]	101 ±17[b]	129 ±22[b]	303 ±16a	535 ±19
5.0	538 ±20	488 ±20	196 ±17[b]	34 ±6[b]	49 ±11[b]	290 ±22a	405 ±8
6.0	536 ±31	584 ±21	113 ±6[b]	18 ±9[b]	29 ±12[b]	59[b]	134[b]
7.0	530 ±49	529 ±32	79 ±12[b]	7 ±1[b]	2[b]	–	–

a:$P<0.05$, b:$P<0.01$,与照射前比较

2.3　不同剂量辐照后裸鼠骨髓涂片中巨核细胞计数动态变化

通过不同辐照剂量照射后,巨核细胞计数检测结果提示:3.0 和 4.0 Gy 组辐照后下降不明显,5.0 Gy 组巨核细胞计数照后 7 ~ 14 d 有明显的降低,至照射后 21 d 基本恢复;6.0 Gy 组在照后 7 ~ 14 d 也有明显降低,但照射后 21 d 仍无法恢复至照射前水平;7.0 Gy 组裸鼠照射后 14 d 全部死亡(表 4)。

表 4　不同剂量辐照后裸鼠骨髓巨核细胞数变化(个/皿)

剂量(Gy)	照射前	1 d	7 d	14 d	21 d
3.0	252 ±34	213 ±20	189 ±11	205 ±9	219 ±18
4.0	233 ±13	212 ±19	167 ±35a	179 ±16	272 ±16
5.0	267 ±38	245 ±42	99 ±12[b]	132 ±8a	209 ±21
6.0	243 ±18	248 ±32	62 ±6[b]	96[ab]	169[b]
7.0	259 ±26	220 ±23	23[b]	–	–

a: $P<0.05$, b:$P<0.01$,与照射前比较

2.4　不同剂量辐照后裸鼠骨髓基质细胞 CFU-F 的动态变化

通过不同辐照剂量照射后 CFU-F 检测结果提示:3.0 Gy 和 4.0 Gy 组辐照后 CFU-F 计数改变不明显,5.0 Gy 组 CFU-F 计数在照射后 7 ~ 14 d 有明显的降低,至照射后 21 d 恢复;6.0 Gy 组 CFU-F 计数在照射后 7 ~ 14 d 也有明显降低,但照射后 21 d 仍无法恢复至照射前水平;7.0 Gy 组裸鼠照射后 14 d 全部死亡(表 5)。

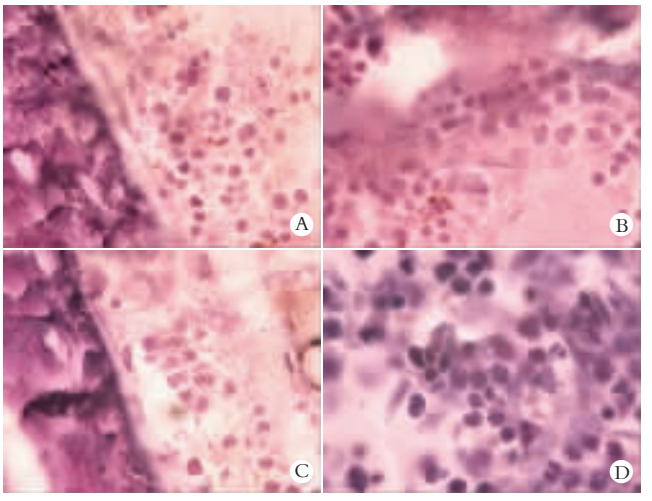
表 5　不同剂量辐照后裸鼠 CFU-F 变化(个/皿)

剂量(Gy)	照射前	7 d	14 d	21 d
3.0	120 ±6	106 ±4	128 ±3	132 ±7
4.0	109 ±4	94 ±7	95 ±3	125 ±5
5.0	118 ±9	81 ±4b	76 ±5a	134 ±6
6.0	132 ±5	35 ±7[b]	38[b]	68[b]
7.0	121 ±10	15[b]	–	–

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$,与照射前比较

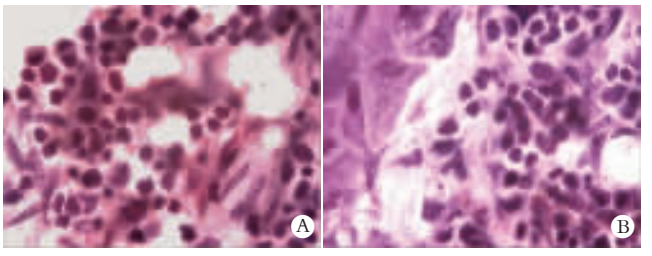
2.5　不同剂量辐照后裸鼠骨髓活组织象变化

观察不同辐照剂量照射后裸鼠骨髓活组织象变化情况,结果显示:3.0 Gy 和 4.0 Gy 照射后裸鼠活组织象变化不大,仅在照射后 7 d 的骨髓组织造血细胞稍减少。5.0 ~ 7.0 Gy 组裸鼠随着放射剂量的增加,骨髓病理切片组织特别是骨小梁旁组织出现特征性变化:骨髓基质细胞胞体变大,排列疏松紊乱,造血细胞数量减少(图 1)。骨髓活检组织象显示,5.0 Gy 组裸鼠照射后 21 d 后骨髓造血前体细胞数量完全恢复至照射前水平(图 2)。



A: 5.0 Gy; B: 6.0 Gy; C: 7.0 Gy; D: 对照组(未照射)

图 1　不同辐照剂量照射后 7 d 裸鼠骨髓组织活检情况　(瑞氏染色 ×1 000)



A: 照射前; B: 照射后 21 d

图 2　5.0 Gy 照射前和照射后 21 d 骨髓组织活检情况　(瑞氏染色 ×1 000)

3　讨论

造血功能障碍是恶性肿瘤化学药物治疗和大剂量放射线治疗的主要并发症之一[4]。严重造血功能障碍可导致发热、贫血、出血等并发症,甚至危及患者生命。目前有关造血功能损伤救治的研究主要集中在造血实质细胞功能的恢复。造血微环境是造血干细胞定居、增殖、分化、发育和成熟的场所,基质细胞是造血微环境的主要成分[5,6]。经大剂量放射线治疗和化疗药物预处理的患者,其骨髓基质细胞支持造血细胞增生的能力明显低于正常对照组[7]。造血微环境损伤比造血实质细胞损伤所导致的造血功能障碍更加持久,甚至不能完全恢复。因此,从改造造血微环境入手探讨造血功能损伤的修复值得深入探讨。

造血组织对放疗敏感,在造血损伤相关研究中通常采用 $Co^{60}\gamma$ 射线辐照小鼠作为造血功能损伤动物模型制备的主要手段[8]。骨髓基质细胞虽较造血细胞有相对较高的辐射耐受性,但造血微环境的辐射损伤较造血细胞更加持久[9]。研究表明引起造血微环境功能损伤所需要的辐射剂量约为5.0 Gy,7.0~8.0 Gy照射后则导致造血微环境造血支持功能严重受损[10]。本实验结果显示:3.0~6.0 Gy 组的裸鼠白细胞均在照射后 3~5 d 降至最低,血红蛋白和血小板分别在7 d和5 d 最低,之后迅速恢复,4.0 Gy 组和6.0 Gy 组裸鼠在照射后均有死亡。当辐照剂量增加至 7.0 Gy 时,裸鼠造血功能不能恢复,在照射后 14 d 之内全部死亡,无法继续进行实验。观察不同辐照剂量照射后巨核细胞和 CFU-F 计数提示:3.0 和 4.0 Gy 组辐照后 CFU-F 计数改变不明显($P>0.05$),5.0 和 6.0 Gy 组 CFU-F 计数在照射后 7~14 d 有明显的降低($P<0.05$),前者至照射后21 d 恢复,后者在照射后21 d 仍无法恢复至照射前水平;7.0 Gy 组裸鼠照射后 14 d 全部死亡。上述结果说明,3.4 Gy 和4.0 Gy 骨髓抑制作用不明显,CFU-F 计数也无显著下降,无法达到损伤裸鼠造血微环境的目的;6.0 Gy 虽然有显著造血微环境损伤,但裸鼠在实验中有死亡,且照射后 21 d CFU-F 仍不能恢复,说明其损伤程度较重,不适宜模拟临床放化疗患者造血微环境损伤的真实情况。5.0 Gy 不仅能够达到一定骨髓抑制,且裸鼠全部存活,符合后续实验的要求。

根据上述实验结果,为了后续更好地观察人脐血源基质细胞(human umbilical blood derived stromal cells, hUCBDSCs)移植在重建造血微环境和促进巨核细胞生成中的作用并排除造血干细胞输注对实验的影响,我们在今后动物实验中选择 5.0 Gy 作为裸鼠造血微环境损伤的实验动物模型的辐照剂量,并拟单纯输注体外培养扩增的 hUCBDSCs,以观察其在重建造血微环境功能、促进巨核细胞生成中的功能。

参考文献:

[1] Epperly M W, Cao S, Zhang X, *et al*. Increased longevity of hematopoiesis in continuous bone marrow cultures derived from NOS1 (nNOS, mtNOS) homozygous recombinant negative mice correlates with radioresistance of hematopoietic and marrow stromal cells[J]. Exp Hematol, 2007, 35(1): 137-145.

[2] Ito Y, Hasauda H, Kitajima T, *et al*. Ex vivo expansion of human cord blood hematopoietic progenitor cells using glutaraldehyde-fixed human bone marrow stromal cells[J]. J Biosci Bioeng, 2006, 102(5): 467-469.

[3] 陈幸华,罗成基. 骨髓基质细胞在造血调控中的作用[J]. 国外医学:临床生物化学与检验学分册,2000,21(1):20-22.

[4] 高 蕾,陈幸华,张曦,等. VCAM-1 修饰人脐血基质细胞对造血干/祖细胞扩增作用的实验研究[J]. 中国病理生理杂志,2007,23(10):1923-1926.

[5] Sanchez-Guijo F M, Sanchez-Abarca L I, Villaron E, *et al*. Posttransplant hematopoiesis in patients undergoing sibling allogeneic stem cell transplantation reflects that of their respective donors although with a lower functional capability[J]. Exp Hematol, 2005, 33(8): 935-943.

[6] Chung N G, Jeong D C, Park S J, *et al*. Cotransplantation of marrow stromal cells may prevent lethal graft-versus-host disease in major histocompatibility complex mismatched murine hematopoietic stem cell transplantation[J]. Int J Hematol, 2004, 80(4): 370-376.

[7] 张 曦,王 苹,陈幸华,等. 外周血干细胞移植患者骨髓基质细胞形态学改变的观察[J]. 中国临床医学,2004,11(4):473-474.

[8] 周 永,弥漫天,朱俊东,等. 三羟异黄酮对小鼠辐射损伤后造血功能的影响[J]. 第三军医大学学报,2007,29(10):866-868.

[9] 周燕虹,罗成基. 理化因素与造血微环境损伤[M]//罗成基,裴雪涛. 造血微环境——基础与临床. 南京:世界医药出版社,2001:193-203.

[10] Herodin F, Roy L, Grenier N, *et al*. Antiapoptotic cytokines in combination with pegfilgrastim soon after irradiation mitigates myelosuppression in nonhuman primates exposed to high irradiation dose[J]. Exp Hematol, 2007, 35(8):1172-1181.

(编辑 王小寒)

参考文献中英文作者名的著录方法

医学期刊的论文中,引用英文文献的比例很高,但有不少作者将英、美人的姓名搞错,以至用光盘核对时出现错姓、错名或姓名全错。英、美人姓名的习惯写法是:名-名-姓,"名"可以有 1 个、2 个或 3 个,但"姓"只有 1 个。因此,从书籍或期刊中的姓名转录到文献时,要将次序调整为姓-名-名。姓是不可以简写的;"名"可以缩写,用第一个字母大写,不用缩写点。数据库在著录作者姓名时,已经调整为姓-名-名,可照录。

例如:John Quincy Public 写为 Public J Q。

本刊编辑部