

奥沙利铂联合X射线照射建立小鼠再生障碍性贫血模型

苏小华^{1,2}, 邓子亮³, 李志东^{1,2}, 刘吉贞^{1,2}, 揭英锦⁴, 胡佳琦⁴, 李剑峰⁵, 李静^{6*}, 李小砚^{1,2*} (1. 广东医科大学实验动物中心, 广东东莞 523808; 2. 广东医科大学东莞市生物医药产业实验动物资源开发与应用研究重点实验室, 广东东莞 523808; 3. 广东医科大学基础医学院, 广东东莞 523808; 4. 广东医科大学附属东莞第一医院, 广东东莞 523710; 5. 广东医科大学医学技术学院, 广东东莞 523808; 6. 广东东阳光药业股份有限公司, 广东东莞 523808)

摘要: **目的** 应用奥沙利铂联合X射线照射建立小鼠再生障碍性贫血模型。**方法** 将10只小鼠随机分为对照组和模型组, 每组5只。模型组于第1、3、5、7、9、11、13、15、17、19天腹腔注射3 mg/kg奥沙利铂, 第7、14天给予3.0 Gy X射线照射; 对照组于相同时间点腹腔注射等剂量生理盐水, 经铅砖遮挡进行假照射。观察小鼠一般状态及身体质量, 第20天进行血液检查、脾脏指数及脾、骨髓病理检查。**结果** 与对照组相比, 模型组小鼠在第1次X射线照射后, 出现精神萎靡; 第2次X射线照射后, 毛色无光泽, 耳、四肢逐渐苍白, 身体质量增长速度明显下降; 脾体积减小、脾脏指数降低 ($P<0.001$); 外周血白细胞、红细胞、血红蛋白、血小板水平显著下降 ($P<0.001$ 或 0.01); HE染色显示脾组织结构疏松, 骨髓有核细胞减少, 存在大量脂肪空泡。**结论** 奥沙利铂联合X射线可建立再生障碍性贫血小鼠模型。

关键词: 再生障碍性贫血; 模型; 小鼠; 奥沙利铂; X射线

中图分类号: R 551.3

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610 (2024) 06-0599-04

Establishment of a mouse model of aplastic anemia using oxaliplatin and X-ray irradiation

SU Xiaohua^{1,2}, DENG Ziliang³, LI Zhidong^{1,2}, LIU Jizhen^{1,2}, JIE Yingjin⁴, HU Jiaqi⁴, LI Jianfeng⁵, LI Jin^{6*}, LI Xiaoyan^{1,2*} (1. Laboratory Animal Center; 2. Dongguan Key Laboratory of Development and Application of Experimental Mobile Materials for Biomedical Industry; 3. School of Basic Medicine; Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China; 4. The First Dongguan Affiliated Hospital, Guangdong Medical University, Dongguan 523710, China; 5. College of Medical Technology, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China; 6. Guangdong Dongsunshine Pharmaceutical Co. LTD., Dongguan 523808, China)

Abstract: **Objective** To establish a mouse model of aplastic anemia using oxaliplatin and X-ray irradiation. **Methods** Ten mice were randomly divided into control group ($n=5$) and model group ($n=5$). The model group were intraperitoneally injected with 3 mg/kg oxaliplatin at 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, and 19 days, and radiated with 3.0 Gy X-ray at 7 and 14 days; while the control group received intraperitoneal injection of the same dose of normal saline and sham irradiation with lead brick shielding at the same timepoints. The general condition and body weight of mice were observed. On the 20th day, blood examination, spleen index and pathological examination of spleen and bone marrow were performed. **Results** Compared with control group, model group showed listlessness after the first X-ray irradiation; dull fur color, gradual paleness of ears and limbs, and decreased weight growth rate after the second X-ray irradiation. The spleen volume and index decreased ($P<0.001$). White blood cells, red blood cells, hemoglobins, and platelets of peripheral blood reduced dramatically ($P<0.001$ or 0.01). Hematoxylin-eosin (HE) stain revealed loose structure of spleen and decreased nucleated cells with numerous fat vacuoles of bone marrow. **Conclusion** Combined oxaliplatin and X-ray irradiation can create an aplastic anemia model in mice.

收稿日期: 2024-10-13

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金项目 (2022A1515140082), 2023年东莞市科技特派员项目 (20231800500132), 广东省研究生教育创新计划项目 (2024JGXM_079), 基于实验动物的生物医药研究本科生创新创业教育基地 (2JD24055), 广东省“新医科”教指委教学改革项目 (2023175), 2023年度本科教学质量工程与教学改革项目 (1JG23141)

作者简介: 苏小华, 女, 博士, 高级实验师, E-mail: xiaohuas08@126.com

通信作者: 李小砚, 女, 硕士, 助理实验师, E-mail: lxyabc@gdmu.edu.cn

李静, 男, 博士, 副主任药师, E-mail: lijing@hec.cn

Key words: aplastic anemia; mice; oxaliplatin; X-ray

再生障碍性贫血(aplastic anemia, AA)是以造血干细胞流失、骨髓抑制和血细胞生产不足为主要特征的骨髓造血功能衰竭性疾病^[1]。研究表明,我国AA的发病率为7.4/100万,是欧洲与北美的2~3倍,且症状更为复杂^[2-4]。目前,AA的发病机制尚未明了,发病率又逐年升高,对患者的生活质量造成极大威胁^[5-6]。因此,构建与人类AA发病症状相似且稳定、可靠的AA动物模型,对研究AA的发病机制及新药治疗具有重大意义。现阶段,构建AA动物模型的方法众多,但各有优势与不足^[7-8]。本文通过探讨构建AA动物模型的新方法,旨在为后续AA的相关研究提供一种理想的实验模型。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 无特定病原体(SPF)级雄性昆明(KM)小鼠10只,身体质量为25~30g,8周龄,由长沙市天勤生物技术有限公司[SCXK(湘)2019-0014]提供。动物饲养于广东医科大学实验动物中心[SYXK(粤)2019-0213],温度为20~26℃,湿度为30%~70%,12h/12h明暗交替,自由饮食和饮水。实验方案通过广东医科大学实验动物伦理委员会批准(编号GDY2304016)。

1.1.2 主要试剂与仪器 奥沙利铂(上海麦克林生化科技股份有限公司,批号C15936808),X射线辐照仪(Rad Source Technologies, RS2000pro),全自动血液分析仪(深圳迈瑞动物医疗科技股份有限公司,BC-75R-Vet)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组与AA模型的建立 KM小鼠适应性喂养1周,按随机数字表法将其分为对照组和模型组,每组5只。于第1、3、5、7、9、11、13、15、17、19天模型组腹腔注射3mg/kg的奥沙利铂,对照组腹腔注射同等剂量生理盐水;第7、14天模型组给予3.0GyX射线照射,对照组经铅砖遮挡实行假照射。观察给药期间两组小鼠状态、体型、毛发状况、耳朵与脚爪颜色等变化,并定期测量小鼠的身体质量,第20天采血、解剖与取材。

1.2.2 外周血细胞检测 第20天采取眼眶后静脉丛取血的方法收集0.1~0.2mL全血于抗凝1.5mLEP管中并做好标记,使用全自动血液分析仪检测外周血细

胞中白细胞(WBC)、红细胞(RBC)、血红蛋白(HGB)和血小板(PLT)参数。

1.2.3 测量脾脏指数 第20天解剖并收集小鼠脾脏,观察脾脏色泽、质地与大小改变,称量并计算脾脏指数(脾脏指数=脾脏质量/身体质量)。

1.2.4 病理学检测 留取小鼠脾脏与左侧股骨进行组织固定,用石蜡包埋切片,HE染色后观察小鼠脾脏、股骨的组织形态及结构变化。

1.2.5 AA模型成功的判定标准 外周血三系细胞明显减少,且骨髓切片显示骨髓增生低下,非造血细胞如脂肪细胞增多,可判定为AA模型^[9]。

1.3 统计学处理

使用统计学软件SPSS 25.0及GraphPad Prism 5.0,计量资料符合正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用独立样本 t 检验与校正 t 检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组小鼠生长状况的比较

对照组小鼠活动正常,精神良好,毛发有光泽,身体质量随时间的推移明显增加;模型组小鼠于第1次X射线照射后活动减弱,精神萎靡,第2次X射线照射后开始脱毛,毛色无光泽,耳朵、四肢逐渐苍白,身体质量增长速度明显下降,如图1和图2所示。采样前模型组小鼠死亡1只。



图1 采样前对照组(左)与模型组(右)小鼠生长状况的比较

2.2 两组小鼠外周血细胞的检测结果

模型组小鼠的WBC、RBC、HGB和PLT明显低

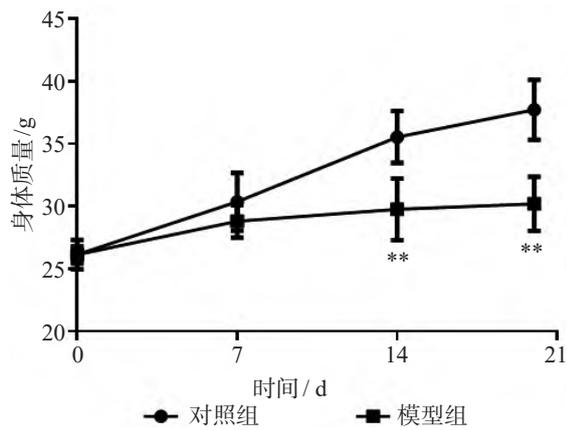


图2 两组小鼠身体质量的变化情况 (** $P<0.01$)

于对照组 ($P<0.001$ 或 0.01), 见表 1。

2.3 两组小鼠脾脏指数的比较

对照组小鼠脾脏大小与颜色均正常, 模型组小鼠

脾脏体积明显减小, 质量减轻, 见图 3。两组小鼠脾脏指数如图 4 所示, 模型组小鼠的脾脏指数明显低于对照组小鼠 ($P<0.001$)。

2.4 小鼠脾脏组织结构发生变化

两组小鼠脾脏层次结构清晰, 可见被膜、红髓、白髓。其中对照组脾脏组织结构致密, 可见清晰的脾小体、中央动脉周围淋巴鞘等白髓结构; 模型组脾脏组织结构相对疏松, 脾小体萎缩。见图 5。

2.5 小鼠骨髓组织结构发生改变

对照组小鼠股骨骨髓腔内组织结构完整, 造血细胞分布均匀, 未见明显脂肪细胞; 模型组小鼠骨髓有核细胞显著减少, 存在大量的脂肪空泡, 见图 6。

3 讨论

AA 作为一种常见的血液系统疾病, 病因、病机复

表 1 两组小鼠外周血细胞检测结果的比较

组别	n	WBC/ $(\times 10^9 \cdot L^{-1})$	RBC/ $(\times 10^{12} \cdot L^{-1})$	HGB/ $(g \cdot L^{-1})$	PLT/ $(\times 10^9 \cdot L^{-1})$
对照组	5	4.38±1.89	8.56±0.51	143.60±3.51	1 061.60±76.27
模型组	4	0.04±0.01 ^a	2.06±0.51 ^b	30.75±5.68 ^b	27.50±6.86 ^b

与对照组比较: ^a $P<0.01$, ^b $P<0.001$



图3 对照组(左侧2个)与模型组小鼠(右侧2个)脾脏对比结果

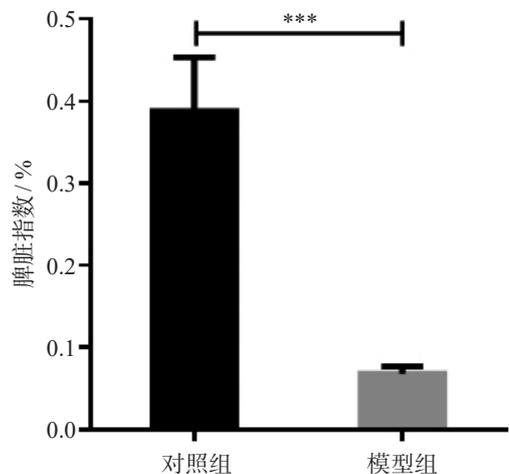
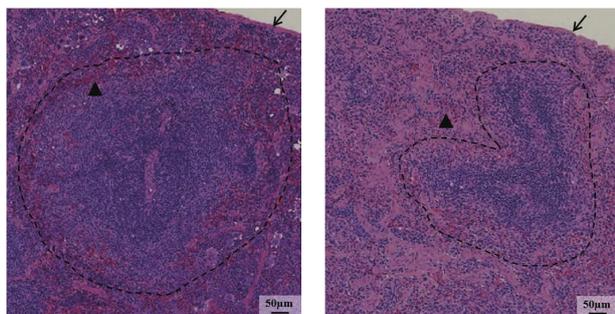


图4 两组小鼠脾脏指数的比较 (** $P<0.001$)



→为被膜; ▲为红髓; 虚线圈出部位为白髓(包括脾小体和中央动脉周围淋巴鞘等)

图5 对照组(左)与模型组(右)脾脏组织切片(HE染色, 40×)

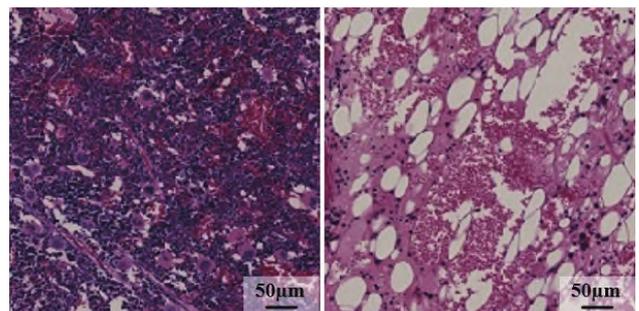


图6 对照组(左)与模型组(右)股髓组织切片(HE染色, 40×)

杂,甚至部分AA患者很难完全治愈,病死率较高^[10-13]。因此,研究一种与人类AA发病症状相似的动物模型显得尤为重要^[14]。目前,关于制作AA动物模型的方法有很多,经典的造模方法有3种,单纯物理或化学方法造模、物理免疫方法造模和物理化学方法造模,各有优势和不足^[7-8]。单纯物理方法,即通过 γ 射线、X射线等对小鼠进行全身照射。此方法采用的射线照射剂量较难把控,照射剂量过大时,会对动物造成全身器官损伤,将导致动物死亡率过高;而照射剂量太小时,动物的造血功能易恢复^[15]。单纯化学方法通常通过腹腔注射化学药物进行造模,常用药物包括苯剂、环磷酰胺、氯霉素等^[16]。此方法造模成本较低,操作简单,但周期较长,存在模型建立不稳定、应用限制较多等缺点^[17]。物理免疫方法,即实验动物经 γ 射线或X射线照射后,4 h后注射异种淋巴细胞混悬液。此方法制作周期短,但操作复杂,存在一定难度^[18]。物理化学方法造模是目前较新颖的造模方式^[19],本研究中所使用的造模方法就属于物理化学方法的一种。小鼠腹腔注射化疗药物奥沙利铂,剂量为3 mg/kg,隔天注射,然后每周给予小鼠3.0 Gy X射线照射,持续20 d,造模结果显示AA动物模型的症状符合AA的临床特征。这种方法综合了前述几种方法的优点,操作简单,有利于后续相关治疗药物疗效研究与机制的探索。

本研究发现,采用单纯注射奥沙利铂或单纯使用X射线照射进行造模时,造模周期较长且模型建立不稳定。预实验中,我们给予小鼠2.0、3.0、4.0和5.0 Gy X射线的照射,发现使用2.0 Gy X射线照射的小鼠基本无明显变化,3.0 Gy X射线照射的小鼠在第18天出现脱毛。小鼠在第1次4.0和5.0 Gy X射线照射后精神萎靡,2~3 d出现脱毛,毛色无光泽;第2次5.0 Gy X射线照射后出现部分死亡。另外,小鼠在腹腔注射奥沙利铂进行造模时,血液分析小鼠外周血WBC、RBC、HGB和PLT水平下降。后续实验将通过调整X射线的剂量以及奥沙利铂的浓度控制AA病情的严重程度,也可通过调整造模周期进而调整患病程度,进一步影响动物的存活时间,为研究不同病程进展情况下的AA治疗方案提供相适应的动物模型。

参考文献:

[1]付蓉,刘春燕.再生障碍性贫血诊断与治疗中国专家共识(2017版)解读[J].临床血液学杂志,2017,30(11):821-825.

- [2]KOJIMA S. Why is the incidence of aplastic anemia higher in Asia?[J]. *Expert Rev Hematol*, 2017, 10(4): 277-279.
- [3]YOUNG N S, KAUFMAN D W. The epidemiology of acquired aplastic anemia[J]. *Haematologica*, 2008, 93(4): 489-492.
- [4]AKRAM Z, AHMED P, KAJIGAYA S, et al. Epidemiological, clinical and genetic characterization of aplastic anemia patients in Pakistan[J]. *Ann Hematol*, 2019, 98(2): 301-312.
- [5]叶宝东,李杭超.中西医结合治疗再生障碍性贫血[J].中国实用内科杂志,2023,43(7):551-555.
- [6]立新,苏力德,奥·乌力吉,等.再生障碍性贫血致病分子机制研究进展[J].中国现代应用药学,2021,38(17):2150-2155.
- [7]吴小凡,周永明.获得性再生障碍性贫血动物模型的研究进展[J].中华中医药杂志,2021,36(6):3488-3490.
- [8]黄晓桃,石博文,吴云霞.再生障碍性贫血动物模型研究进展[J].中西医结合研究,2022,14(2):115-118.
- [9]王振城.血液病诊断与治疗[M].天津:天津科学技术出版社,2018:81-83.
- [10]张子冉,李冬华.再生障碍性贫血中医病因病机及治疗的研究进展[J].中国现代医生,2024,62(18):129-131.
- [11]SHIMANO K A, NARLA A, ROSE M J, et al. Diagnostic work-up for severe aplastic anemia in children: consensus of the North American Pediatric Aplastic Anemia Consortium[J]. *Am J Hematol*, 2021, 96(11): 1491-1504.
- [12]GALE R P, HINTERBERGER W, YOUNG N S, et al. What causes aplastic anaemia?[J]. *Leukemia*, 2023, 37(6): 1191-1193.
- [13]李秋爽,沈怡雯,季聪华,等.再生障碍性贫血发病影响因素的Meta分析[J].预防医学,2018,30(4):382-386.
- [14]贾媛,王真真,李秀敏,等.基于中西医临床病症特点的再生障碍性贫血动物模型分析[J].中药药理与临床,2021,37(1):216-221.
- [15]孙婷婷,徐文瑞,祝晓玲.再生障碍性贫血动物模型研究概况[J].中药药理与临床,2012,28(2):191-193.
- [16]石健菲,焦丹丽,赵琛,等.环磷酰胺联合环孢霉素介导的获得性再生障碍性贫血小鼠模型的建立[J].中国实验血液学杂志,2022,30(1):222-226.
- [17]罗东,罗月苹,刘宝茹,等.新西兰兔再生障碍性贫血模型的建立[J].南方医科大学学报,2017,37(12):1660-1666.
- [18]张梓倩,李姝仪,袁继巧,等.免疫介导再生障碍性贫血小鼠模型制备条件的实验比较研究[J].中国药理学通报,2020,36(8):1178-1183.
- [19]王萍萍,李佳妮,宋新龙,等.获得性再生障碍性贫血SD大鼠模型的建立[J].中国实验血液学杂志,2020,28(3):927-931.

(责任编辑:李 晓)