

# 免疫诱导 IRM-2 小鼠再生障碍性贫血模型的研究

张丽娟 马蕊 王月英 李德冠

300192 天津, 中国医学科学院放射医学研究所, 天津市放射医学与分子核医学重点实验室

通信作者: 李德冠, Email: lideguan@irm-cams.ac.cn

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2016.02.008

**【摘要】目的** 建立 IRM-2 小鼠再生障碍性贫血(AA)实验动物模型, 并检测其血液及相关免疫学指标。**方法** IRM-2 小鼠经  $^{137}\text{Cs}$   $\gamma$  射线 6 Gy 照射后, 输入 DBA/2 小鼠的胸腺细胞, 建成免疫介导型 AA 模型。实验分 3 组, 即对照组、照射组和 AA 模型组, 于照射后第 15 天检测小鼠的血常规和免疫学指标。**结果** IRM-2 小鼠 AA 模型组外周血 WBC、RBC、骨髓有核细胞数和网织红细胞百分比分别为  $(2.38 \pm 0.53) \times 10^9/\text{L}$ 、 $(8.22 \pm 0.21) \times 10^{12}/\text{L}$ 、 $(7.14 \pm 1.19) \times 10^6/\text{股骨}$  和  $(50.2 \pm 8.9)\%$ , 均低于对照组 [ $(8.23 \pm 0.41) \times 10^9/\text{L}$ 、 $(10.24 \pm 0.91) \times 10^{12}/\text{L}$ 、 $(16.5 \pm 1.61) \times 10^6/\text{股骨}$  和  $(76.2 \pm 9.7)\%$ ]; IRM-2 小鼠 AA 模型组免疫学指标中  $\text{CD4}^+$  细胞比例  $[(8.91 \pm 2.55)\%]$  低于对照组  $[(16.14 \pm 3.09)\%]$ ,  $\text{CD8}^+$  细胞比例  $[(13.55 \pm 2.12)\%]$  高于对照组  $[(6.83 \pm 1.14)\%]$ 。IRM-2 小鼠 AA 模型组外周血及免疫学指标与对照组比较, 差异均具有统计学意义。**结论** IRM-2 小鼠 AA 动物模型的建立, 对 AA 的研究具有较好的应用价值。

**【关键词】** 贫血, 再生障碍性; 模型, 动物; 免疫诱导; 评价研究

**基金项目:** 国家自然科学基金(81372928); 天津市重点基金(15JCZDJC35200); 中国医学科学院放射医学研究所开发基金(1539)

**Immune-induced aplastic anemia IRM-2 mice model research** Zhang Lijuan, Ma Rui, Wang Yueying, Li Deguan

Tianjin Key Laboratory of Radiation Medicine and Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300192, China

Corresponding author: Li Deguan, Email: lideguan@irm-cams.ac.cn

**【Abstract】 Objective** To perform traditional blood and immunologic examinations for the pathogenesis of immune-induced aplastic anemia(AA) IRM-2 mice model. **Methods** IRM-2 mice were divided into three groups, namely, the control, radiation, and AA model groups. IRM-2 inbred mice in the AA model group were used to set up the AA model by whole body  $^{137}\text{Cs}$   $\gamma$  irradiation and eye venous plexus injection with DBA/2 mice thymus cells. After 15 days of radiation, blood and bone marrow cells were counted, and immunologic detection was performed. **Results** The peripheral WBC, RBC, bone marrow cells, and reticulocyte  $[(2.38 \pm 0.53) \times 10^9/\text{L}$ ,  $(8.22 \pm 0.21) \times 10^{12}/\text{L}$ ,  $(7.14 \pm 1.19) \times 10^6/\text{femur}$ , and  $(50.2 \pm 8.9)\%$ ] in the AA model group were lower than those of the control group [ $(8.23 \pm 0.41) \times 10^9/\text{L}$ ,  $(10.24 \pm 0.91) \times 10^{12}/\text{L}$ ,  $(16.5 \pm 1.61) \times 10^6/\text{femur}$ , and  $(76.2 \pm 9.7)\%$ ].  $\text{CD4}^+$  cells  $[(8.91 \pm 2.55)\%]$  of the AA model group were lower than those of the control group  $[(16.14 \pm 3.09)\%]$ , whereas  $\text{CD8}^+$  cells  $[(13.55 \pm 2.12)\%]$  were higher than those of the control group  $[(6.83 \pm 1.14)\%]$ . Peripheral blood and immunological indexes of the AA model group were statistically different from those of the control group. **Conclusion** IRM-2 mice AA model was successfully established as a good model for the study of AA.

**【Key words】** Anemia, aplastic; Models, animal; Immune induction; Evaluation studies

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China(81372928); Natural Science Foundation of Tianjin(15JCZDJC35200); Research Fund of Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences(1539)

再生障碍性贫血(aplastic anemia, AA)是一种骨髓造血功能衰竭症,是以全血细胞减少为主要表现的一种综合征<sup>[1]</sup>。近年来,对AA的机制研究已逐渐深入到分子生物学水平,动物模型的建立是研究其机制的基础。建立动物模型的方法主要包括物理、化学和免疫介导等,很多学者进行了多方面的探索和改进。本研究运用电离辐射及免疫介导在IRM-2小鼠中建立AA小鼠模型,在此基础上对AA小鼠模型的全血细胞、网织红细胞(reticulocyte, Ret)、骨髓及免疫学指标进行了检测,为AA的发病机理、药物筛选及防治研究提供了较好的动物模型。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

DBA/2近交系小鼠,雄性,5只,体重22~24g,由中国医学科学院实验动物研究所提供,合格证号:SCXK(京)2005-0013;IRM-2近交系小鼠由我所培育<sup>[2-3]</sup>,雄性,30只,体重22~24g,合格证号:SCXK(津)2005-0001。

### 1.2 主要仪器与试剂

<sup>137</sup>Cs  $\gamma$ 照射源(CAMMA-CELL40,加拿大原子能有限公司),照射剂量为6Gy,剂量率为0.84Gy/min;Coulter Ahra流式细胞仪购自美国Beckman公司;pocH-100i血细胞计数仪购自日本希森美康公司;RPMI-1640培养基、小牛血清均购自美国Gibco公司;异硫氰酸荧光素标记的兔抗鼠CD4抗体、藻红蛋白标记的兔抗鼠CD8抗体均购自美国Ebioscience公司。

### 1.3 分组与照射方法

将IRM-2小鼠按体重分为3组,即对照组、照射组、AA模型组,每组10只,每组小鼠平均体重差异不能大于1,从而尽可能减少每组小鼠的生物差异性。其中,照射组和AA模型组小鼠接受6.0Gy <sup>137</sup>Cs  $\gamma$ 射线一次性全身照射。

### 1.4 AA模型小鼠的建立

处死DBA/2小鼠,取出胸腺,加入含10%胎牛血清的RPMI-1640培养液进行研磨,过滤,制成细胞浓度为 $5 \times 10^6$ 个/ml的单个细胞悬液,经眼静脉丛注入照射后的IRM-2小鼠体内,0.2ml/只。对照组和照射组注入等量的RPMI-1640培养液。

### 1.5 外周血常规指标的测定

照射后15d,通过小鼠眼球取血200  $\mu$ l,

用血细胞计数仪测量外周血WBC、RBC、血小板数和血红蛋白(hemoglobin, HGB)含量。

### 1.6 Ret及骨髓有核细胞(bone marrow nucleated cells, BMNC)计数

同1.5中的方法取血100  $\mu$ l,用1%煌焦油蓝染色,在显微镜下计数Ret;取出小鼠单侧股骨,冲出骨髓,用血细胞计数仪测定BMNC。另取外周血,裂解红细胞后分别加入相应抗体进行避光孵育,用流式细胞仪检测CD4、CD8、CD40、CD80/86、B220等指标。

### 1.7 统计学方法

所有数据处理采用SPSS16.0软件进行分析,统计结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组比较采用 $t$ 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 AA模型小鼠外周血指标

AA模型小鼠外周血各指标计数结果见表1,由表可见,AA模型小鼠的WBC、RBC、HGB含量和血小板数均比对照组和照射组低,其中,与对照组和照射组比较,WBC、RBC和血小板数差异均有统计学意义(WBC:  $t=27.603$ 、 $7.835$ ,  $P$ 均 $<0.05$ ; RBC:  $t=6.841$ 、 $6.016$ ,  $P$ 均 $<0.05$ ;血小板:  $t=13.944$ 、 $6.737$ ,  $P$ 均 $<0.05$ );与对照组比较,HGB含量差异有统计学意义( $t=5.063$ ,  $P < 0.05$ )。

### 2.2 AA模型小鼠BMNC和Ret

AA模型小鼠BMNC数和Ret百分比结果见表2,由表可见,AA模型小鼠BMNC数和Ret百分比均比对照组和照射组低,且差异有统计学意义(BMNC:  $t=15.867$ 、 $2.773$ ,  $P$ 均 $<0.05$ ; Ret:  $t=6.245$ 、 $3.084$ ,  $P$ 均 $<0.05$ )。

### 2.3 AA模型小鼠外周血免疫学分型

AA模型小鼠外周血免疫学分型结果见表3,由表可见,AA模型小鼠CD4<sup>+</sup>细胞比例低于对照

表1 AA模型小鼠外周血各指标计数( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 The counts of peripheral blood indexes in aplastic anemia

model( $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	WBC ( $\times 10^9/L$ )	RBC ( $\times 10^{12}/L$ )	HGB (g/L)	血小板 ( $\times 10^9/L$ )
对照组	10	8.23 $\pm$ 0.41	10.24 $\pm$ 0.91	149.7 $\pm$ 11.6	1216.4 $\pm$ 78.1
照射组	10	4.82 $\pm$ 0.83	9.83 $\pm$ 0.82	132.1 $\pm$ 12.1	996.2 $\pm$ 132.1
AA模型组	10	2.38 $\pm$ 0.53	8.22 $\pm$ 0.21	121.2 $\pm$ 13.5	635.1 $\pm$ 106.2

注:表中,AA:再生障碍性贫血;HGB:血红蛋白。

**表 2** AA 模型小鼠骨髓有核细胞数和网织红细胞百分比( $\bar{x}\pm s$ )

**Table 2** The count of BMNC and percentage of Ret in aplastic anemia model( $\bar{x}\pm s$ )

组别	只数	BMNC( $\times 10^6$ /股骨)	Ret(%)
对照组	10	16.5 $\pm$ 1.61	76.2 $\pm$ 9.7
照射组	10	9.28 $\pm$ 2.13	59.8 $\pm$ 4.2
AA 模型组	10	7.14 $\pm$ 1.19	50.2 $\pm$ 8.9

注:表中,AA:再生障碍性贫血;BMNC:骨髓有核细胞;Ret:网织红细胞。

组,差异有统计学意义( $t=5.963, P<0.05$ ); CD8<sup>+</sup>、CD40<sup>+</sup>、CD80<sup>+</sup>/86<sup>+</sup>细胞比例均高于对照组和照射组,且差异有统计学意义(CD8<sup>+</sup>:  $t=8.829、8.048, P$ 均 $<0.05$ ; CD40<sup>+</sup>:  $t=10.767、11.072, P$ 均 $<0.05$ ; CD80<sup>+</sup>/86<sup>+</sup>:  $t=6.988、9.241, P$ 均 $<0.05$ ); B220<sup>+</sup>细胞比例高于对照组,差异有统计学意义( $t=2.172, P<0.05$ ); CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>值低于对照组和照射组,差异有统计学意义( $t=5.085、3.718, P$ 均 $<0.05$ )。

### 3 讨论

AA 是一类以造血组织功能衰竭为特征的综合征<sup>[1,4-5]</sup>,主要表现为骨髓造血功能低下及外周血全血细胞减少,AA 具有治愈难、病势延缓的特点,目前认为该病的主要发病机制为造血干细胞减少或缺损、造血微环境损伤以及 T 淋巴细胞功能亢进。针对不同发病机制,建立 AA 动物模型,对于深入研究 AA 发病机制和选择有效的治疗靶点具有重要的临床意义。目前,先天性 AA 动物模型,诸如 Fanc A<sup>-/-</sup>、Fanc C<sup>-/-</sup>、Fanc G<sup>-/-</sup>、Fanc D1<sup>-/-</sup>/Fanc 2<sup>-/-</sup>、Fanc D2<sup>-/-</sup>等小鼠及其他基因缺陷小鼠的 AA 模型较多<sup>[6]</sup>,而用电离辐射及免疫介导方法建立 AA 模型小鼠较少,本研究用该方法成功建立了 AA 模型小鼠。目前对 AA 动物模型评价的主要指标包括:全血细胞、Ret 和骨髓象三系血细胞<sup>[1,4]</sup>,本研究对 AA 模型小鼠全血细胞、Ret、BMNC 的检测结果表

明,AA 模型组小鼠 WBC、RBC、血小板数和 HGB 含量均低于对照组和照射组,BMNC 数及 Ret 百分比显著下降,与对照组和照射组比较差异有统计学意义。本研究建立的 AA 模型小鼠,其外周血常规、Ret 百分比和 BMNC 数等指标均符合 AA 动物模型的要求,与临床 AA 患者各项指标相符或相近,证明了本研究建立的 AA 动物模型是成功的。AA 的发病机理除与造血干细胞本身缺陷、造血微环境损伤有关外,免疫功能异常也是一个重要的因素。CD4<sup>+</sup>细胞是具有辅助诱导性的 T 细胞亚群(Th),其增多表示 B 细胞产生的免疫球蛋白增多及细胞免疫力增强,CD8<sup>+</sup>是抑制性 T 细胞(Ts)中的细胞毒性 T 细胞(Tc)亚群,其增多表示免疫抑制;CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>值表示 Th 与 Ts 之间的功能平衡状态,是人体免疫系统内环境稳定的重要指标,该比值降低可引起机体免疫功能紊乱。AA 患者的外周血 CD4<sup>+</sup>细胞比例降低,CD8<sup>+</sup>细胞比例升高,CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>值失调;本研究结果表明,AA 模型小鼠 CD4<sup>+</sup>细胞比例低于对照组,CD8<sup>+</sup>细胞比例高于对照组,CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>值失调,这与临床上 AA 患者的情况基本相符<sup>[5-6]</sup>。T 细胞活化相关的共刺激分子 CD40<sup>+</sup>、CD80<sup>+</sup>/86<sup>+</sup>等也参与了 AA 的发病过程,CD40<sup>+</sup>属于肿瘤坏死因子受体超家族,其表达异常是 AA 患者免疫功能紊乱的原因之一;CD80<sup>+</sup>/86<sup>+</sup>分子表达于抗原提呈细胞上,并介导了对 AA 患者造血机能的破坏。本研究中 AA 模型小鼠 CD40<sup>+</sup>、CD80<sup>+</sup>/86<sup>+</sup>细胞比例高于对照组和照射组,表明体液免疫和细胞免疫都可能增强并参与 AA 的发生,这与临床对 AA 患者的研究结果相符<sup>[7-9]</sup>,从结果可以看出,本研究建立的 AA 模型小鼠的 BMNC 数、Ret 百分比、外周血及分型等指标的变化与人类 AA 患者各项指标相符或相近,说明本研究成功构建了 AA 动物模型,对 AA 的研究具有较好的应用价值。

(下转第 138 页)

**表 3** AA 模型小鼠外周血淋巴细胞亚群比例( $\bar{x}\pm s$ )

**Table 3** The percentage of lymphocyte subsets in peripheral blood in aplastic anemia model( $\bar{x}\pm s$ )

组别	只数	CD4 <sup>+</sup> (%)	CD8 <sup>+</sup> (%)	B220 <sup>+</sup> (%)	CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> 值	CD40 <sup>+</sup> (%)	CD80 <sup>+</sup> /86 <sup>+</sup> (%)
对照组	10	16.14 $\pm$ 3.09	6.83 $\pm$ 1.14	33.86 $\pm$ 6.39	2.51 $\pm$ 0.91	13.33 $\pm$ 1.36	21.12 $\pm$ 6.06
照射组	10	10.36 $\pm$ 6.22	7.14 $\pm$ 1.36	41.78 $\pm$ 8.26	1.82 $\pm$ 0.87	11.26 $\pm$ 2.12	15.38 $\pm$ 6.35
AA 模型组	10	8.91 $\pm$ 2.55	13.55 $\pm$ 2.12	40.31 $\pm$ 6.88	0.73 $\pm$ 0.32	20.93 $\pm$ 1.77	36.64 $\pm$ 3.55

注:表中,AA:再生障碍性贫血。

- 6\_12.
- [15] Liu X, Li D, Zhang W, et al. Long non-coding RNA gadd7 interacts with TDP-43 and regulates Cdk6 mRNA decay[J]. *EMBO J*, 2012, 31(23): 4415–4427. DOI: 10.1038/emboj.2012.292.
- [16] Rossi MN, Antonangeli F. LncRNAs: new players in apoptosis control[J/OL]. *Int J Cell Biol*, 2014, 2014: 473857[2015–11–24]. <http://www.hindawi.com/journals/ijcb/2014/473857>. DOI: 10.1155/2014/473857.
- [17] Huarte M, Guttman M, Feldser D, et al. A large intergenic noncoding RNA induced by p53 mediates global gene repression in the p53 response[J]. *Cell*, 2010, 142(3): 409–419. DOI:10.1016/j.cell.2010.06.040.
- [18] Zhang C, Peng G. Non-coding RNAs: an emerging player in DNA damage response[J]. *Mutat Res Rev Mutat Res*, 2015, 763: 202–211. DOI:10.1016/j.mrrev.2014.11.003.
- [19] Mok MT, Henderson BR. Three-dimensional imaging reveals the spatial separation of  $\gamma$ H2AX-MDC1-53BP1 and RNF8-RNF168-BRCA1-A complexes at ionizing radiation-induced foci[J]. *Radiother Oncol*, 2012, 103(3): 415–420. DOI:10.1016/j.radonc.2012.04.009.
- [20] Pflingsten JS, Goodrich KJ, Taabazuing C, et al. Mutually exclusive binding of telomerase RNA and DNA by Ku alters telomerase recruitment model[J]. *Cell*, 2012, 148(5): 922–932. DOI:10.1016/j.cell.2012.01.033.
- [21] Lee YH, Kuo CY, Stark JM, et al. HP1 promotes tumor suppressor BRCA1 functions during the DNA damage response[J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(11): 5784–5798. DOI:10.1093/nar/gkt231.
- [22] Adamson B, Smogorzewska A, Sigoillot FD, et al. A genome-wide homologous recombination screen identifies the RNA-binding protein RBMX as a component of the DNA-damage response[J]. *Nat Cell Biol*, 2012, 14(3): 318–328. DOI:10.1038/ncb2426.
- [23] Nguyen D, Grenier St-Sauveur V, Bergeron D, et al. A Polyadenylation-Dependent 3' end maturation pathway is required for the synthesis of the human telomerase RNA[J]. *Cell Rep*, 2015, 13(10): 2244–2257. DOI:10.1016/j.celrep.2015.11.003.
- [24] Schoeftner S, Blasco MA. Chromatin regulation and non-coding RNAs at mammalian telomeres[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2010, 21(2): 186–193. DOI:10.1016/j.semcdb.2009.09.015.
- [25] Wan G, Hu X, Liu Y, et al. A novel non-coding RNA lncRNA-JADE connects DNA damage signalling to histone H4 acetylation[J]. *EMBO J*, 2013, 32(21): 2833–2847. DOI: 10.1038/emboj.2013.221.
- [26] Prensner JR, Chen W, Iyer MK, et al. PCAT-1, a long noncoding RNA, regulates BRCA2 and controls homologous recombination in cancer[J]. *Cancer Res*, 2014, 74(6): 1651–1660. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-13-3159.

(Received by 2015–11–24)

(上接第 127 页)

**利益冲突** 本研究由署名作者按以下贡献声明独立开展, 不涉及任何利益冲突。

**作者贡献声明** 张丽娟、马蕊、王月英负责方法建立、现场实验、论文撰写等工作; 李德冠负责方法建立、论文审阅等工作。

### 参 考 文 献

- [1] Găman A, Găman G, Bold A. Acquired aplastic anemia: correlation between etiology, pathophysiology, bone marrow histology and prognosis factors[J]. *Rom J Morphol Embryol*, 2009, 50(4): 669–674.
- [2] 王月英, 吴红英, 李德冠, 等. 不同剂量  $^{137}\text{Cs}$   $\gamma$  射线照射对小鼠造血系统的影响[J]. *国际放射医学核医学杂志*, 2013, 37(1): 1–4. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2013.01.001.  
Wang YY, Wu HY, Li DG, et al. Effects of different  $^{137}\text{Cs}$   $\gamma$  radiation dose on mouse hematopoietic system[J]. *Int J Radiat Med Nucl Med*, 2013, 37(1): 1–4.
- [3] 王月英, 吴红英, 李德冠, 等. 小鼠不同肿瘤模型对放疗化疗敏感性的研究[J]. *国际放射医学核医学杂志*, 2012, 36(5): 289–292. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2012.05.006.  
Wang YY, Wu HY, Li DG, et al. The radiation sensitivities of different mice tumor model to radiotherapy and chemotherapy[J]. *Int J Radiat Med Nucl Med*, 2012, 36(5): 289–292.
- [4] Bloom ML, Wolk AG, Simon-Stoos KL, et al. A mouse model of lymphocyte infusion-induced bone marrow failure[J]. *Exp Hematol*, 2004, 32(12): 1163–1172. DOI: 10.1016/j.exphem.2004.08.006.
- [5] Barnes DW, Mole RH. Aplastic anaemia in sublethally irradiated mice given allogeneic lymph node cells[J]. *Br J Haematol*, 1967, 13(4): 482–491.
- [6] 张宇辰, 赵明峰. 针对不同发病机制建立再生障碍性贫血动物模型的研究概况[J]. *中国实验血液学杂志*, 2015, 23(1): 285–289.  
Zhang YC, Zhao MF. Establishing aplastic anemia animal model based on different pathogenesis[J]. *J Experiment Hematol*, 2015, 23(1): 285–289.
- [7] 张榕, 李运碧, 李戈, 等. 32例再生障碍性贫血患儿淋巴细胞免疫分析及临床意义[J]. *现代临床医学*, 2009, 35(1): 17–19. DOI: 10.3969/j.issn.1673-1557.2009.01.007.  
Zhang R, Li YB, Li G, et al. Analysis and clinical significance of lymphocyte immune in 32 cases of children aplastic anemia[J]. *J Modern Clin Med*, 2009, 35(1): 17–19.
- [8] Zeng W, Nakao S, Takamatsu H, et al. Characterization of T-cell repertoire of the bone marrow in immune-mediated aplastic anemia: evidence for the involvement of antigen-driven T-cell response in cyclosporine-dependent aplastic anemia[J]. *Blood*, 1999, 93(9): 3008–3016. DOI: <http://dx.doi.org>.
- [9] 郑智茵, 尹利明, 庄海峰, 等. 人参二醇组皂苷提取物对再生障碍性贫血小鼠免疫调节作用的研究[J]. *中国药理学通报*, 2015, 31(6): 790–794, 795.  
Zheng ZY, Yin LM, Zhuang HF, et al. Effects of PDS-C on immunoregulation in mice with aplastic anemia[J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2015, 31(6): 790–794, 795.

(收稿日期: 2016-01-06)