

重组人 γ -干扰素联合白消安诱导建立小鼠重型再生障碍性贫血模型

刘 香, 钟淑萍, 侯丽君, 谢 锋, 李学刚, 庞文正, 徐景勃, 何志国(中山大学附属第五医院血液科, 广东省珠海市 519000)

文章亮点:

- 1 实验首次应用重组人 γ -干扰素联合白消安成功建立小鼠重型再生障碍性贫血模型。该造模方法操作简便, 造模周期短, 费用低, 稳定性好。
- 2 该方案建立的再生障碍性贫血小鼠模型骨髓抑制严重持久且不可逆, 是一种新型、理想的再生障碍性贫血动物模型, 对研究再生障碍性贫血的发病机制及寻找新的再生障碍性贫血治疗方法具有重要的意义。

关键词:

实验动物; 组织构建; 再生障碍性贫血; 修复重建; 动物模型; 重组人 γ -干扰素; 白消安

主题词:

贫血, 再生障碍性; 模型, 动物; 干扰素 γ

基金资助:

珠海市科技计划项目(2013D0401990016)

摘要

背景: 建立理想的重型再生障碍性贫血动物模型对探究再生障碍性贫血发病机制及筛选有效防治药物尤为重要。

目的: 应用注射用重组人 γ -干扰素联合白消安建立小鼠重型再生障碍性贫血模型。

方法: 选择健康雌性昆明小鼠 60 只, 随机分为再生障碍性贫血造模组($n=50$)和对照组($n=10$)。再生障碍性贫血造模组予重组人 γ -干扰素 1×10^4 U/d 腹腔注射, 以白消安 $18 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 灌胃, 均连续用药 7 d; 对照组给予同等容量生理盐水灌胃及腹腔注射。比较两组间一般情况、体质量及血细胞计数, 并观察再生障碍性贫血造模组小鼠骨髓细胞形态学及骨髓活组织病理学的变化。

结果与结论: 给药第 7 天时, 再生障碍性贫血造模组小鼠体质量、白细胞、血红蛋白、血小板及网织红细胞计数均较对照组明显下降, 差异有显著性意义($P < 0.05$); 骨髓细胞形态学及骨髓活组织病理学检查显示再生障碍性贫血造模组小鼠骨髓增生极度减低, 非造血细胞团相对易见, 油滴明显增多, 脂肪空泡明显。提示联合应用重组人 γ -干扰素和白消安能成功建立小鼠重型再生障碍性贫血模型, 该造模方法操作简便, 费用低, 稳定性好。

刘香, 钟淑萍, 侯丽君, 谢锋, 李学刚, 庞文正, 徐景勃, 何志国. 重组人 γ -干扰素联合白消安诱导建立小鼠重型再生障碍性贫血模型[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(36):5868-5873.

Establishment of a severe aplastic anemia mouse model by using recombinant human interferon-gamma plus busulfan

Liu Xiang, Zhong Shu-ping, Hou Li-jun, Xie Feng, Li Xue-gang, Pang Wen-zheng, Xu Jing-bo, He Zhi-guo (Department of Hematology, the Fifth Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Zhuhai 519000, Guangdong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: It is important to establish an ideal mouse model of severe aplastic anemia for investigating the mechanism and finding new therapies for aplastic anemia.

OBJECTIVE: To establish a severe aplastic anemia mouse model by using recombinant human interferon- γ and busulfan.

METHODS: Sixty healthy Kunming female mice were randomly divided into two groups: model group ($n=50$) and control group ($n=10$). The model group was given recombinant human interferon- γ at a dose of 1×10^4 U/d by intraperitoneal injection and busulfan at a dose of $18 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ through stomach feeding for 7 days. The same volume of physiological saline was given to control group. Multi-parameters, including general condition, body weight, blood cell count, morphology and biopsy of bone marrow were analyzed in two groups.

RESULTS AND CONCLUSION: At day 7 after treatment, the weight, white blood cell count, hemoglobin, blood platelet, reticulocyte count in model group were significantly lower than control group ($P < 0.05$). Bone marrow smears and biopsy of model group showed marked reduction of bone marrow proliferation and increases of percentages of non-hematopoietic cell clusters and adipose tissue. The oil drop and fat vacuole were apparently seen in the model group. Severe aplastic anemia mouse model can be established by using recombinant human interferon- γ and busulfan successfully, which is economic, stable and easy to operate.

刘香, 女, 1987 年生, 湖南省人, 汉族, 2013 年中山大学毕业, 硕士, 医师, 主要从事血液病的诊治研究。

通讯作者: 钟淑萍, 硕士, 主治医师, 中山大学附属第五医院血液科, 广东省珠海市 519000

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.

2014.36.022

[http://www.crter.org]

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2014)36-05868-06

稿件接受: 2014-06-03

Liu Xiang, Master, Physician, Department of Hematology, the Fifth Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Zhuhai 519000, Guangdong Province, China

Corresponding author: Zhong Shu-ping, Master, Attending physician, Department of Hematology, the Fifth Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Zhuhai 519000, Guangdong Province, China

Accepted: 2014-06-03

Subject headings: anemia, aplastic; model, mouse; interferon- γ

Funding: Science and Technology Program of Zhuhai City, No. 2013D0401990016

Liu X, Zhong SP, Hou LJ, Xie F, Li XG, Pang WZ, Xu JB, He ZG. Establishment of a severe aplastic anemia mouse model by using recombinant human interferon-gamma plus busulfan. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014; 18(36):5868-5873.

0 引言 Introduction

再生障碍性贫血是一种由不同病因引起的骨髓造血功能衰竭性疾病, 以造血干细胞减少、骨髓脂肪化和外周血全血细胞减少为特征^[1], 临床上表现为贫血、感染和出血。再生障碍性贫血病因不明, 与药物、化学毒物、电离辐射、病毒感染及免疫因素有关。其发病机制主要涉及3方面: 即干细胞减少或缺陷、造血微环境紊乱和免疫异常。目前已经有越来越多的研究表明, 再生障碍性贫血是一种自身免疫性疾病^[2], 但其发病机制仍未完全阐明。治疗方面, 强化免疫抑制治疗和同胞供者异基因造血干细胞移植成为再生障碍性贫血的两大标准疗法^[3], 但是急性重型再生障碍性贫血患者早期死亡率高, 不易获得HLA相合的配型, 强化免疫抑制治疗后复发率仍相当高^[4], 使再生障碍性贫血的治疗依然面临困难^[5]。为探究再生障碍性贫血发病机制及筛选有效防治药物, 建立理想的再生障碍性贫血动物模型显得尤为重要。

血细胞的生成过程是造血干/祖细胞不断增殖分化的过程, 阻断其任一过程均可造成造血系统调控的紊乱, 因此可采用化学、物理、免疫介导等不同的方法建立再生障碍性贫血动物模型^[6]。

化学方法主要是通过注射化学药物引起再生障碍性贫血动物模型, 常用的药物有白消安、环磷酰胺、氯霉素、苯、乙酰苯肼、5-氟尿嘧啶等。Gibson等^[7]的研究发现单独应用白消安可建立慢性再生障碍性贫血小鼠模型, 其主要缺点是建模时间太长。⁶⁰Co- γ 射线照射是建立再生障碍性贫血动物模型的常用物理方法, 但需要特殊设备及防备, 操作不方便, 且辐射剂量难以控制, 剂量过大容易致动物死亡, 过小则动物造血功能又容易恢复; 除能引起造血功能障碍外, 还会引起全身各器官损伤, 毒副作用非常大。孙纪元等^[8]用物理化学方法建立再生障碍性贫血动物模型, 造模时间短, 但再生障碍性贫血期不稳定, 后期有造血功能自发恢复倾向。免疫介导再生障碍性贫血模型稳定性好^[9], 但实验操作复杂, 条件要求极高。上述建模方法均有其缺点, 或造模时间过长, 或造模方法复杂, 或再生障碍性贫血期不稳定。

国内有学者联合鼠源性 γ -干扰素和白消安成功建立再生障碍性贫血动物模型^[10], 应用此方法建立的再生障碍性贫血模型其调节性T细胞的变化与人类再生障碍性贫血相同^[11]。人和小鼠的 γ -干扰素有65%同源性, 因重组人 γ -干扰素价格低廉, 容易获得, 且稳定性好, 常应用于鼠试验中。

为探索一种操作简便、费用低、稳定性高的理想重型再生障碍性贫血动物模型, 课题组首次应用重组人 γ -干扰素联合白消安成功建立重型再生障碍性贫血动物模型, 稳定性好。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 前瞻性随机对照实验。

时间及地点: 于2012年9月至2013年12月在中山大学第五附属医院中心实验室、中山大学北校区动物实验中心完成。

材料:

实验动物: 健康雌性SPF级昆明小鼠60只, 体质量18-22 g, 购自中山大学动物实验中心, 许可证号: SCXK(粤)2011-0029。饲养环境温度(22±3) °C, 相对湿度(55±2)%。

实验过程中对动物的处置方法符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

小鼠重型再生障碍性贫血模型建立实验的主要试剂及仪器:

试剂与仪器	来源
注射用重组人 γ -干扰素	上海凯茂生物医药有限公司
白消安	GSK 公司产品
CELL-DYN 3700 型全自动血细胞分析	美国雅培公司
倒置光学显微镜	日本 OLYMPOS 产品

方法:

再生障碍性贫血小鼠模型的建立: 雌性昆明小鼠60只, 适应性喂养2 d后, 按随机数字表法分为再生障碍性贫血造模组($n=50$)和对照组($n=10$)。将白消安片剂研磨并加入生理盐水均匀混合成2 g/L悬液, 再生障碍性贫血造模组小鼠均连续7 d予注射用重组人 γ -干扰素 1×10^4 U/d腹腔注射, 同时予以白消安18 mg/(kg·d)灌胃, 对照组予以同等剂量生理盐水灌胃及腹腔注射^[10-11]。

再生障碍性贫血小鼠模型的评判: 再生障碍性贫血小鼠模型的评判标准依据小鼠外周血常规检测和骨髓象分析: 外周血三系细胞减少、网织红细胞减少, 骨髓活镜示骨髓增生不良或低下、非造血细胞(脂肪细胞)增多。急性重型再生障碍性贫血小鼠模型的评判标准: 发病急, 贫血进行性加重, 严重感染和出血, 血象具备下述3项中的2项: ①网织红细胞绝对值小于 15×10^9 L⁻¹。②中性粒细胞计数小

表1 两组小鼠给药前后体质量比较

Table 1 The weight of mice in model group and control group before and after treatment ($\bar{x}\pm s$, g)

组别	n	给药前	给药后 7 d	给药后 14 d
对照组	10	19.7 \pm 1.37	26.9 \pm 0.99	30.7 \pm 1.64
再生障碍性贫血造模组	7	20.8 \pm 1.87	16.8 \pm 2.05 ^a	13.6 \pm 0.96 ^a

表注: 与对照组比较, ^a $P < 0.01$ 。结果显示, 给药后 7 d 和 14 d 再生障碍性贫血造模组体质量较对照组下降($P < 0.01$)。

于 $0.5 \times 10^9 L^{-1}$ 。③血小板小于 $20 \times 10^9 L^{-1}$ 。骨髓增生广泛重度减低。

标本的采集和处理:

血标本: 再生障碍性贫血造模组分别于给药第3, 5, 7及14天随机取2, 8, 10, 7只小鼠采集眼眶静脉血0.5 mL, 行外周血细胞计数分析及网织红细胞计数, 对照组于第14天以同样方法采血(10只)。

骨髓液及骨髓组织标本: 再生障碍性贫血造模组分别于给药第3, 5, 7及14天, 随机取2, 8, 10, 7只小鼠, 游离左侧股骨, 剪开两端使骨髓腔完全暴露, 用空气快速吹打出骨髓液并迅速涂片, 并游离右侧股骨, 将其置于体积分数10%中性甲醛溶液(pH=7.0)固定。对照组于第14天取10只小鼠进行相同标本制作。

主要观察指标:

小鼠一般情况及体质量: 观察小鼠的活动度、毛发、外部形态、精神状况及体质量变化, 解剖小鼠观察内脏。

血液常规检测: 应用CELL-DYN 3700型全自动血细胞分析仪检测血标本的白细胞、红细胞、血红蛋白、血小板、网织红细胞计数水平。

骨髓细胞形态学检查: 骨髓涂片进行Wright-Giemsa混合染色, 显微镜下观察骨髓增生程度。

骨组织病理学检查(苏木精-伊红染色法): 将甲醛固定的股骨送广州金域医学检验中心进行切片制作, 显微镜下观察骨髓增生程度。

统计学分析: 采用SPSS 13.0统计软件进行数据处理, 实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 两组均数比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 纳入小鼠60只, 分成再生障碍性贫血造模组和对照组, 自然死亡23只, 27只小鼠进入结果分析, 纳入分析的造模组小鼠符合急性重型再生障碍性贫血的标准。

2.2 小鼠一般情况、体质量变化 再生障碍性贫血造模组自给药第3天起部分小鼠开始出现眼睑出血, 睁眼困难, 给药第4天开始出现毛发干枯、稀疏、活动迟缓、反应迟钝, 面部浮肿、眼周分泌物明显增多、出血等症状, 体质量下降, 第6天自然死亡1只, 第7-13天自然死亡22只, 至第14

天时剩余7只小鼠均呈濒死状态。另于第3, 5, 7天采集血液及骨髓标本分别处死了2, 8, 10只小鼠, 解剖后可见肠壁广泛出血, 部分出现肠坏死。

对照组小鼠给药后一般状态良好, 活动灵敏, 体质量呈上升趋势, 未出现死亡。

如表1所示, 再生障碍性贫血造模组与对照组小鼠给药前体质量差异无显著性意义, 给药后7 d和14 d再生障碍性贫血造模组体质量较对照组下降, 差异有非常显著性意义。

2.3 血细胞计数 再生障碍性贫血造模组自给药第3天开始出现血象下降, 白细胞下降最明显, 其次是血小板, 血红蛋白下降不明显, 至第5天部分小鼠已进入粒缺状态, 中性粒细胞比例明显下降, 淋巴细胞比例明显升高, 再生障碍性贫血造模组网织红细胞计数亦自第3天起出现下降, 并且随着给药时间的延长呈进行性下降。

如表2所示, 给药第7天, 再生障碍性贫血造模组白细胞、血小板、血红蛋白与对照组比较差异有显著性意义($P < 0.05$), 至第14天, 与对照组比较差异有显著性意义($P < 0.05$), 但再生障碍性贫血造模组给药第7天与给药第14天比较血细胞计数差异无显著性意义($P > 0.05$)。

2.4 骨髓细胞形态学观察结果 对照组小鼠骨髓细胞增生极度活跃, 红系、粒系和巨核系均匀分布(图1A, B)。

再生障碍性贫血造模组小鼠给药第3天时, 骨髓有核细胞增生尚可, 粒系、红系增生活跃, 巨核细胞减少; 给药第5天, 小鼠骨髓增生减低, 可见油滴及脂肪空泡; 至给药第7天, 小鼠骨髓增生极度减低, 红系、粒系、巨核细胞系均明显减少, 非造血细胞团易见, 油滴明显增多, 脂肪空泡明显(图1C, D), 与人类重型再生障碍性贫血骨髓象相似; 至第14天时, 小鼠骨髓呈重度抑制状态, 骨髓小粒空虚(图1E, F)。

2.5 骨髓组织病理形态学观察结果 对照组小鼠骨髓活组织病理学检查显示骨髓有核细胞增生极度活跃, 增生程度 $>95\%$ (图2A, B)。

再生障碍性贫血组小鼠给药第7天骨髓组织病理学检查显示骨髓增生极度减低, 增生程度 $<1\%$, 未见巨核细胞, 偶见红系、粒系细胞, 淋巴细胞散在分布, 造血组织明显减少, 被大量脂肪组织代替, 间质血窦充血、出血伴水肿(图2C, D)。

3 讨论 Discussion

再生障碍性贫血是造血干细胞缺陷、造血微环境异常及免疫功能紊乱而导致的一类以造血组织功能衰竭为特征性疾病。目前, 国内外建立再生障碍性贫血动物模型的方法有物理、化学、免疫介导及物理化学等方法^[12], 其中免疫介导再生障碍性贫血模型接近于人类的再生障碍性贫血, 但是实验操作复杂, 一般的实验室不能完成, 费用也

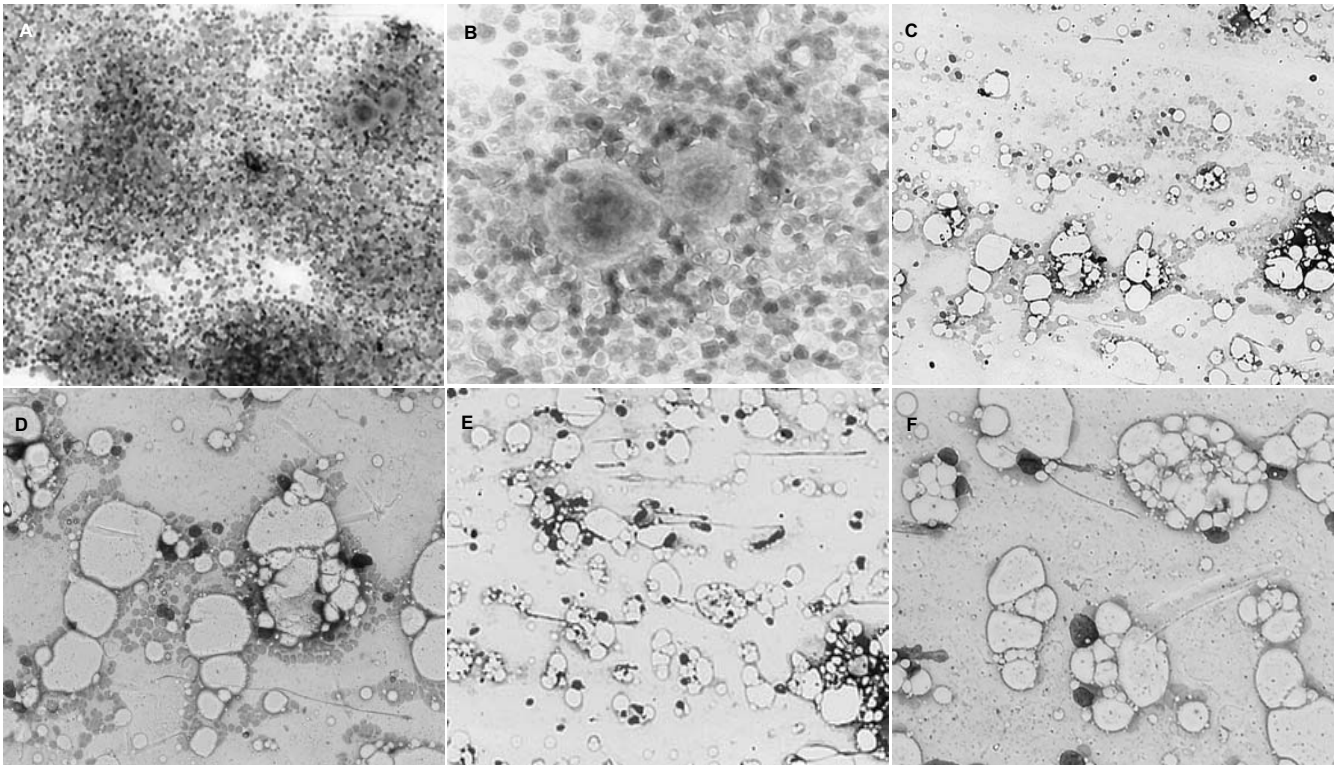


图 1 两组小鼠骨髓细胞形态(瑞特-吉姆萨混合染色)

Figure 1 Morphology of bone marrow cells in two groups (Wright-Giemsa mixed dyeing)

图注: A, B 为对照组小鼠骨髓细胞形态($\times 100$, $\times 400$), 显示骨髓细胞增生极度活跃, 红系、粒系和巨核系均匀分布。C, D 为再生障碍性贫血造模组给药第 7 天小鼠骨髓细胞形态($\times 100$, $\times 400$), 显示骨髓增生极度减低, 红系、粒系、巨核系均明显减少, 非造血细胞易见, 油滴明显增多, 脂肪空泡明显; E, F 为再生障碍性贫血造模组给药第 14 天小鼠骨髓细胞形态($\times 100$, $\times 400$), 显示骨髓增生仍极度减低, 红系、粒系、巨核细胞系明显减少, 油滴增多, 脂肪空泡明显, 骨髓小粒空虚。

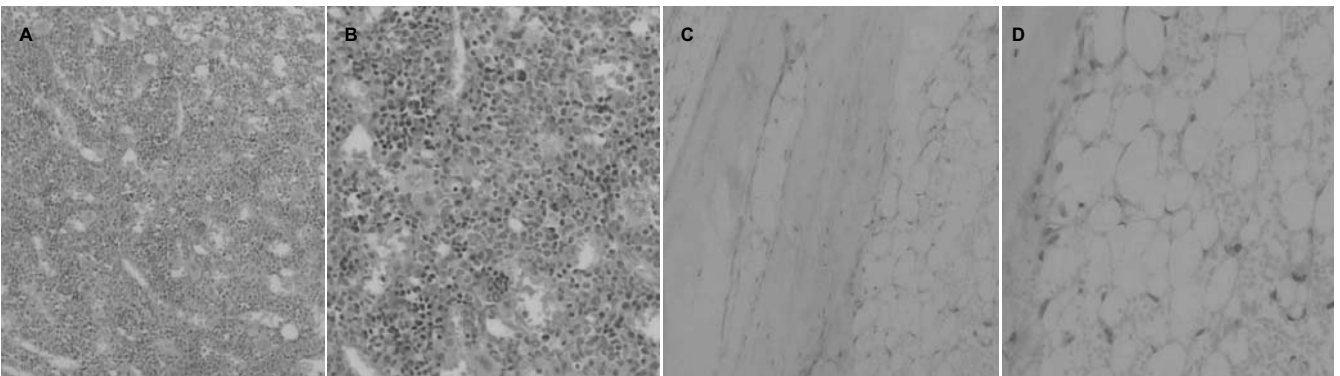


图 2 两组小鼠骨髓组织病理形态学观察结果(苏木精-伊红染色)

Figure 2 Bone marrow biopsy results in two groups (hematoxylin-eosin staining)

图注: A, B 为对照组小鼠骨髓活检结果($\times 100$, $\times 200$), 显示骨髓有核细胞增生极度活跃, 增生程度 $>95\%$; C, D 再生障碍性贫血造模组给药第 7 天骨髓活检结果($\times 100$, $\times 200$), 显示骨髓增生极度减低, 增生程度 $<1\%$, 未见巨核细胞, 偶见红系、粒系细胞, 淋巴细胞散在分布, 造血组织明显减少, 被大量脂肪组织代替。

表 2 两组小鼠给药不同时间点外周血象变化

Table 2 Peripheral blood cell count of mice at different time

组别	给药时间(d)	n	白细胞($\times 10^9 L^{-1}$)	血红蛋白(g/L)	血小板($\times 10^9 L^{-1}$)	网织红细胞($\times 10^9 L^{-1}$)
对照组	14	10	5.11 \pm 1.75	163.10 \pm 7.22	566.50 \pm 92.53	322.35 \pm 58.59
再生障碍性 贫血造模组	7	10	0.19 \pm 0.12 ^a	126.30 \pm 7.47 ^a	59.90 \pm 28.82 ^a	8.69 \pm 1.65 ^a
	14	7	0.17 \pm 0.14 ^a	121.57 \pm 4.72 ^a	54.10 \pm 24.19 ^a	8.39 \pm 1.30 ^a

表注: 与对照组比较, ^a $P < 0.01$ 。结果显示, 给药第 7, 14 天, 再生障碍性贫血造模组白细胞、血小板、血红蛋白、网织红细胞计数较对照组下降($P < 0.05$)。

昂贵^[13-15]。

为探索一种接近人类再生障碍性贫血、稳定性好、操作简便、实验费用低的重型再生障碍性贫血造模方法, 本实验探索应用注射用重组人 γ -干扰素联合白消安建立重型再生障碍性贫血小鼠模型。

既往研究发现, 再生障碍性贫血患者骨髓和外周血中 γ -干扰素明显增多^[16-17], γ -干扰素是导致再生障碍性贫血发生发展的最重要的细胞因子^[18-19], 动物实验证实了 γ -干扰素通过多种途径影响造血干细胞增殖过程中的调控因子和基因表达, 导致造血干细胞的增殖分化能力下降、干细胞数量减少^[20-24]。

γ -干扰素在人和小鼠基因分别定位在12号和10号染色体上, 小鼠成熟 γ -干扰素分子由133个氨基酸残基组成, 人 γ -干扰素成熟分子由143个氨基酸组成, 糖蛋白以同源双体形式存在, 相对分子质量为40 000。人和小鼠的 γ -干扰素有65%同源性, 人重组 γ -干扰素容易获得, 价格低廉但稳定性好, 因此常应用于鼠的动物实验^[25]。

白消安属于磺酸类抗肿瘤药物, 能导致造血干细胞增殖缺陷和造成骨髓间质损伤^[24]。白消安最早于1974年应用于再生障碍性贫血造模, 单用白消安可建立慢性再生障碍性贫血小鼠模型, 其主要缺点是建模时间过长, 模型不稳定^[7]。

在作者的预实验中, 连续7 d单用白消安18 mg/(kg·d), 小鼠在二至三周后出现骨髓抑制但程度较轻, 而白消安联合 γ -干扰素组小鼠骨髓抑制较早出现, 程度重, 满足本实验所需。

基于上述机制及预实验结果, 本实验在以往实验的基础上进行改进, 选择注射用重组人 γ -干扰素联合应用白消安, 以期建立一个造模周期短而不可逆的重型再生障碍性贫血小鼠模型。

实验结果表明, 此方案诱导重型再生障碍性贫血小鼠模型的成功率高达100%, 在给药后第3天即出现血象下降和出血。给药第7天, 外周血全血细胞明显减低、网织红细胞比例明显下降, 与对照组相比差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 其中白细胞、血小板下降尤为明显, 且随着时间延长而持续下降。至第14天时全部小鼠均呈濒死状态, 而血常规无明显恢复趋势, 与给药第7天再生障碍性贫血组相比差异无显著性意义 ($P > 0.05$), 表明该再生障碍性贫血模型无自发恢复造血功能倾向, 呈不可逆性。

而红细胞计数、血红蛋白虽随时间延长呈进行性下降, 但其下降速度比较缓慢, 这可能与红细胞寿命较长有关。网织红细胞寿命较短, 只有一至两天, 故在给药后第3天即显著下降, 并维持在低水平。骨髓细胞形态学检查显示骨髓有核细胞增生极度低下, 髓系、红系明显减少, 巨核细胞罕见, 脂肪化明显, 可见非造血细胞, 与人类重型再生障碍性贫血骨髓像相似。

再生障碍性贫血是一组以造血组织功能衰竭为特征的综合征, 对外周血常规检测和骨髓象分析是再生障碍性贫血动物模型的基本评估方法^[26]。

小鼠重型再生障碍性贫血的评判标准依据人重型再生障碍性贫血的标准, 即发病急, 贫血进行性加重, 严重感染和出血, 血象具备下述3项中的2项: ①网织红细胞绝对值小于 $15 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 。②中性粒细胞计数小于 $0.5 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 。③血小板小于 $20 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 。骨髓增生广泛重度减低。

在本实验中, 再生障碍性贫血造模组小鼠的中性粒细胞和网织红细胞下降水平达到重型再生障碍性贫血的标准。再生障碍性贫血的发病与免疫紊乱有关, 再生障碍性贫血患者自身反应性T细胞活化增殖^[27], 导致体内免疫耐受被打破。调节T细胞是维持体内免疫平衡的T细胞亚群, 再生障碍性贫血患者体内调节T细胞数量减少^[28-29]。

因此, 理想的再生障碍性贫血动物模型在免疫学发生机制应与人类再生障碍性贫血一致。周志刚等^[11]应用 γ -干扰素联合白消安诱导小鼠重型再生障碍性贫血动物模型, 该模型调节性T细胞的变化与人类再生障碍性贫血相同。

结论: 本实验结果证实该方案能成功建立重型再生障碍性贫血动物模型, 操作简便, 造模时间短, 给药7 d左右能建立重型再生障碍性贫血小鼠模型, 骨髓象接近人类重型再生障碍性贫血, 成功率及稳定性高, 而且费用低。本造模方案的主要创新之处在于首次将注射用重组人 γ -干扰素应用于再生障碍性贫血的造模中, 其来源简单、价格便宜。该方案建立的再生障碍性贫血小鼠模型骨髓抑制严重持久且不可逆, 是一种新型、理想的再生障碍性贫血动物模型, 对研究再生障碍性贫血的发病机制及寻找新的再生障碍性贫血治疗方法具有广泛的用途。

致谢: 感谢中山大学附属第五医院中心实验室彭晓主任、检验科杨斌主任对实验的指导。

作者贡献: 实验设计侯丽君、钟淑萍, 实验实施刘香、谢锋、李学刚、庞文正、徐景勃、何志国, 刘香成文, 钟淑萍审校, 刘香、钟淑萍对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

学术术语: 骨髓衰竭综合征-是一组源于造血干细胞和(或)祖细胞损伤的骨髓衰竭疾病, 累及血细胞一系或多系(红细胞系、粒-单核细胞系、巨核细胞系)。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Dolberg OJ, Levy Y. Idiopathic aplastic anemia: Diagnosis and classification. *Autoimmun Rev*. 2014.
- [2] Young NS. Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2013;2013:76-81.
- [3] Scheinberg P, Young NS. How I treat acquired aplastic anemia. *Blood*. 2012;120(6):1185-1196.
- [4] Risitano AM, Perna F. Aplastic anemia: immunosuppressive therapy in 2010. *Pediatr Rep*. 2011;3 Suppl 2:e7.
- [5] Marsh JC, Kulasekararaj AG. Management of the refractory aplastic anemia patient: what are the options? *Blood*. 2013;122(22):3561-3567.
- [6] 李欣娜,李魏.骨髓抑制动物模型建立方法综述[J].黑龙江医药,2008,21(2):24-27.
- [7] Gibson FM, Andrews CM, Diamanti P, et al. A new model of busulphan-induced chronic bone marrow aplasia in the female BALB/c mouse. *Int J Exp Pathol*. 2003;84(1):31-48.
- [8] 孙纪元,王四旺,谢艳华,等.再生障碍性贫血的动物模型实验研究[J].中国实验动物学杂志,2000,10(4):210-212.
- [9] 黄永兰,黄绍良,蔡耘.骨髓间充质干细胞输注对再生障碍性贫血模型小鼠骨髓造血功能的影响[J].中国实验血液学杂志,2007,15(5):1005-1008.
- [10] 宁方颖,林赠华,刘红,等.干扰素- γ 与白消安合用诱导建立小鼠重型再生障碍性贫血模型的研究[J].中华血液学杂志,2011,32(11):777-782.
- [11] 周志刚,吴文忠,陈亚峰,等. γ 干扰素联合白消安诱导建立小鼠重型再生障碍性贫血模型中调节性T细胞的变化[J].广东医学,2013,34(2):184-186.
- [12] 林庚庭,魏克民,张俊杰.再生障碍性贫血动物模型研究进展[J].浙江中西医结合杂志,2004,14(3):22-23.
- [13] 卢玮,陈国安.免疫介导再生障碍性贫血动物模型的建立[J].实用临床医学,2010,11(10):124-126.
- [14] 姚军,李树浓.淋巴细胞与再生障碍性贫血关系的实验研究[J].中华血液学杂志,1991,12(5):229-231.
- [15] 潘景轩,朱振宇.免疫介导再生障碍性贫血小鼠血清诱导骨髓造血细胞凋亡及其机制初探[J].中华血液学杂志,1998,19(10):510-513.
- [16] Dufour C, Corcione A, Svahn J, et al. Interferon gamma and tumour necrosis factor alpha are overexpressed in bone marrow T lymphocytes from paediatric patients with aplastic anaemia. *Br J Haematol*. 2001;115(4):1023-1031.
- [17] Maciejewski JP, Sloand EM, Nunez O, et al. Recombinant humanized anti-IL-2 receptor antibody (daclizumab) produces responses in patients with moderate aplastic anemia. *Blood*. 2003;102(10):3584-3586.
- [18] Nistico A, Young NS. gamma-Interferon gene expression in the bone marrow of patients with aplastic anemia. *Ann Intern Med*. 1994;120(6):463-469.
- [19] Li JP, Zheng CL, Han ZC. Abnormal immunity and stem/progenitor cells in acquired aplastic anemia. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2010;75(2):79-93.
- [20] de Bruin AM, Demirel O, Hooibrink B, et al. Interferon-gamma impairs proliferation of hematopoietic stem cells in mice. *Blood*. 2013;121(18):3578-3585.
- [21] Welsh JP, Rutherford TR, Flynn J, et al. In vitro effects of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha on CD34+ bone marrow progenitor cells from aplastic anemia patients and normal donors. *Hematol J*. 2004;5(1):39-46.
- [22] Dai C, Krantz SB. Interferon gamma induces upregulation and activation of caspases 1, 3, and 8 to produce apoptosis in human erythroid progenitor cells. *Blood*. 1999;93(10):3309-3316.
- [23] Platanias LC. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(5):375-386.
- [24] Chatterjee S, Dutta RK, Basak P, et al. Alteration in marrow stromal microenvironment and apoptosis mechanisms involved in aplastic anemia: an animal model to study the possible disease pathology. *Stem Cells Int*. 2010;2010:932354.
- [25] 赵英良,李建成,陈剑兵,等. γ -干扰素的研究及应用进展[J].江西畜牧兽医杂志,2009,28(1):6-9.
- [26] 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.
- [27] Hu X, Gu Y, Wang Y, et al. Increased CD4⁺ and CD8⁺ effector memory T cells in patients with aplastic anemia. *Haematologica*. 2009;94(3):428-429.
- [28] Shi J, Ge M, Lu S, et al. Intrinsic impairment of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in acquired aplastic anemia. *Blood*. 2012;120(8):1624-1632.
- [29] Kordasti S, Marsh J, Al-Khan S, et al. Functional characterization of CD4⁺ T cells in aplastic anemia. *Blood*. 2012;119(9):2033-2043.