

doi:10.3969/j.issn.1674-4616.2022.02.013

• 文献综述 •

再生障碍性贫血动物模型研究进展

黄晓桃¹ 石博文² 吴云霞^{2△}

¹华中科技大学同济医学院附属湖北省妇幼保健院中西医结合科,武汉 430070

²华中科技大学同济医学院药学院药理系,武汉 430030

关键词 再生障碍性贫血;动物模型;骨髓

中图分类号 R556.5;R-332 **文献标志码** A

再生障碍性贫血(aplastic anemia, AA),是一组造血组织功能衰竭综合征,其发病机制与造血干细胞损伤、造血微环境受损、免疫功能异常特别是 T 细胞功能亢进和细胞毒性 T 淋巴细胞直接杀伤骨髓造血干细胞以及淋巴因子介导的造血干细胞过度凋亡引起的骨髓造血细胞减少和功能衰竭有关。从病因方面 AA 可分为先天性和后天性,其中,先天性 AA 又称范科尼贫血(Fanconi anemia, FA)。现普遍认为,FA 与 22 种不同基因突变所导致 DNA 双链对交联剂高度敏感、染色体损伤以及 DNA 双链交联修复功能缺失有关,将这些与 FA 有关的基因称为 FANC 基因。在实验室中常用的 FA 造模方法包括 G2 期电离辐射法和 FANC 基因敲除法。而后天性 AA 的动物模型则可基于其产生机制的不同,而采用不同的造模方法。本文将结合所得文献,介绍并总结当前最为常用的几种实验室 AA 动物模型造模方法。

1 AA 动物模型的通用评价标准^[1-3]

动物体态改变:AA 造模成功的动物,包括小鼠、大鼠和兔等,常会出现体重下降、精神萎靡、耳廓苍白、眯眼弓背、毛发蓬松竖立且无光泽等变化。

血象变化:AA 模型动物相对于正常的对照组动物出现全血细胞减少,白细胞(white blood cell, WBC)中以中性粒细胞减少最为明显,红细胞(red blood cell, RBC)及血红蛋白(hemoglobin, Hb)水平显著下降,网织红细胞(reticulocyte, RET)和血小板(platelet, PLT)数量减少。

骨髓象变化:AA 模型动物的骨髓涂片中骨髓脂肪化明显,骨髓有核细胞减少,非造血细胞增多,镜下可见空泡数量明显增多,出现较大和特大空泡。

2 FA 动物模型造模方法

2.1 G2 期电离辐射法

Zahnreich S 等^[4]通过对 G2 期的皮肤和肺成纤维细胞进行 X 射线照射,发现实验细胞的 H2AX(一种 H2A 组蛋白的变型)、53BP1(一种 DNA 修复因子)或 RPA(一种与 DNA 双链断裂修复相关的蛋白)定量异常;同时通过细胞遗传学分析,发现在 G1 期及 G2 期照射后可见染色体过早凝聚, DNA 双链之间出现无法修复的交联,表现出与临床上 FA 一致的细胞改变。

2.2 基因敲除法

2.2.1 直接敲除 FANC 基因 Zhang H 等^[5]在进行 FA 相关实验时采用了生物公司制作的 Fancd2^{-/-}基因敲除小鼠,使用基因敲除所得到的小鼠其 FA 发病机制与临床上人类 FA 发病机制具有高度一致性,因此在实验室进行 FA 相关实验时常使用 FANC 相关基因敲除小鼠。但由于使用 FANC 相关基因敲除小鼠所制作的 FA 模型并不能完全重现人类 FA 的所有临床表现,故而在运用方面亦具有一定的局限性^[6]。

2.2.2 敲除可对 FANC 基因产生作用的其他基因如 Jamsai D 等^[7]在使用 GGN^{-/-}基因敲除小鼠时发现 GGN 的最大亚型 GGN1 可与 FANC 基因的关键组分 FANCD2(一种由 FANC 基因编码的关键蛋白)相互作用,在敲除掉 GGN 基因后,敲除小鼠表现出对丝裂霉素 C 的高度敏感性并且出现大量染色体异常等类似于 FA 的临床症状。

2.2.3 骨髓细胞端粒缩短法 Bär C 等^[8]通过敲除小鼠的 Trf1 基因,使得造血干细胞出现代偿性增生而出现端粒迅速缩短,进而导致了基因敲除小鼠的 WBC、Hb、RBC 和 PLT 水平明显降低。但现在普遍认为,临床人类 FA 贫血的发病机制是通过作用于

△通信作者, Corresponding author, E-mail: wuyunxia@hust.edu.cn

FANC 基因介导的 DNA 修复途径导致 DNA 的交联和染色体破坏,因此通过该法制造的 FA 小鼠仅在外周血象及骨髓象表现与临床 FA 具有相似性。

3 后天性 AA 动物模型造模方法

3.1 物理方法造模

该方法是基于造血干细胞减少导致贫血的发病机理而设计的,过去常使用 76 Gy ^{60}Co γ 射线对实验动物进行全身照射(剂量率为 1 Gy/min),该法所制得 AA 动物模型基本符合人类临床 AA 发病特点且制作周期短^[9],但由于使用射线单独造模难以控制照射量,经常导致动物因过量照射死亡,并且还存在设备不便、需要特殊防护、操作繁琐、对人体存在伤害等问题,因此现在常使用物理射线联合化学药品(氯霉素、环磷酰胺)进行复合造模,所得动物模型具有较好稳定性,且操作比较简便。

3.2 物理联合化学方法造模

张乐等^[10]将 BALB/c 小鼠于第 1 天予以 3.0 Gy ^{137}Cs γ 射线照射(剂量为 91 Gy/min),之后分别于第 4 天、第 5 天、第 6 天予以环磷酰胺、氯霉素腹腔注射;结果模型小鼠血液 WBC 和 PLT 水平迅速下降, Hb 和 RET 显著减少;经骨髓象检查发现骨髓有核细胞数量显著减少,于镜下观察到大量脂肪细胞和非造血细胞增生;该动物模型符合 AA 的临床表现。通过该方法制得的 AA 小鼠模型骨髓衰竭持续时间长,生存率也相对稳定,因此在近几年的 AA 造模中常使用复合方法造模,而较少使用单独射线照射造模。

3.3 化学方法造模

3.3.1 苯 最早应用于 AA 造模的化学试剂是苯剂,苯及其代谢产物在体内超过一定限度可对造血系统产生严重伤害致使造血微环境损伤,从而导致 AA 的发生。贺今等^[11]将小鼠背侧皮下注射玉米油与苯油的混合液(苯剂量 2 mL/kg),分别于造模第 5 天、第 10 天、第 15 天、第 20 天和第 25 天注射;最后一次注射后第 2 天抽查外周血象,可见其 WBC、RBC、Hb、PLT 和 RET 水平明显下降;通过其骨髓象检查发现,小鼠造血面积显著减少,脂肪细胞增多,骨髓间质血窦充血。通过苯间断注射诱导 AA 动物模型不仅使得外周血象各指标均显著下降,而且造模成功后没有引起小鼠死亡,因而此种造模方式明显优于射线照射造模。外周血免疫学分析结果显示,模型组 CD4^+ 细胞比例低于对照组, CD8^+ 细胞比例高于对照组, $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ 比例低于对照组;表明在实验动物模型的发病过程中有细胞免疫的参与,这与临床上 AA 具

有一致性。

3.3.2 5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)联合白消安

5-FU 为抗代谢药,主要杀伤处于增殖周期内的细胞,而非增殖周期内的细胞则不会受到杀伤作用,且 5-FU 主要富集在骨髓中,其骨髓中浓度为血浆浓度 2 倍,因而可以导致造血功能损伤。白消安属于烷化剂,为细胞周期非特异性药物,由于其血液毒性将会对造血细胞进行杀伤,可与 5-FU 同用产生协同作用。苏攀柯等^[2]将 SD 大鼠第 1 天予以 5-FU 腹腔注射 150 mg/kg,第 5 天予以白消安蒸馏水悬液灌胃 15 mg/kg;一周后进行外周血象检查,显示 WBC、Hb 和 RBC 水平均明显减少;骨髓涂片可见骨髓非造血细胞增生明显,脂肪化严重,骨髓有核细胞数量大幅减少,出现大空泡;该动物模型的血象及骨髓象较为接近临床人类 AA。

3.3.3 环磷酰胺联合白消安 由于环磷酰胺与白消安均可导致造血干细胞损伤,Chen YF 等^[12]将 ICR 小鼠使用环磷酰胺 40 mg/kg 和白消安 20 mg/kg 联合皮下注射 12 d 后进行外周血象检查,结果与对照组相比,模型组小鼠 WBC、RBC、Hb、PLT 和骨髓有核细胞计数分别显著下降 64.32%、42.33%、20.04%、61.53%和 68.25%;骨髓检查发现骨髓有核细胞数量大幅减少,脂肪化严重,出现大空泡;这些指标表明该法所造的动物模型与临床 AA 的表现基本一致。

3.3.4 重组人 γ -干扰素联合白消安 刘香等^[13]选用重组人 γ -干扰素联合白消安进行造模,他们通过使用干扰素以达到类似于免疫介导所致 T 细胞功能亢进的效果,从而使用较为简单的方法以制造与免疫介导方法相近的 AA 模型,因此此种方法也可归属于免疫介导方法。使用该法制造的 AA 模型在第 7 天时出现 WBC、PLT、Hb 水平下降,与对照组第 7 天相比具有显著差异,在第 14 天时 AA 模型鼠的血象与对照组比较仍显著下降,第 7 天与第 14 天血象比较则无显著差异。这表明使用该法所得到的模型鼠表现出与 AA 相似的血象变化,且该造模方法具有较好的稳定性。

除了上述方法以外,还有采用乙酰苯肼联合环磷酰胺腹腔注射以建立 AA 大鼠模型^[14]以及使用氯霉素^[15]进行 AA 造模,这些动物模型其病理表现也接近于人类 AA。越来越多的研究表明,联合使用化学试剂制造 AA 动物模型,其机制都有免疫细胞的参与,病理表现较接近于人类 AA 的临床病理表现。

3.4 免疫介导法造模

免疫介导是通过诱导 T 淋巴细胞功能亢进并产生细胞毒性 T 淋巴细胞而导致 AA 的动物模型制造

方法,由于 T 淋巴细胞功能亢进是临床 AA 最重要的发病机制,因此该方法制造的动物模型是最能反映临床状况的动物模型。该造模方法包括病毒感染和淋巴细胞输注。前者主要用于 FA 的基因治疗,Czechowicz A 等^[16]报道了由携带 FANC 相关基因的慢病毒进行儿童 FA 的临床基因治疗,而在实验室中普遍使用的是淋巴细胞输注法制造 AA 模型。Wu D 等^[17]将 DBA/2 小鼠通过颈椎脱臼法处死后收获胸腺并制备成细胞悬液,再将细胞悬液通过尾静脉注射进入经过 Co 照射 4 h 后的小鼠体内,第 10 天时检查其外周血象发现 AA 组小鼠 WBC、Hb、RBC 和 PLT 水平明显降低,而且其骨髓检查也出现了经典的 AA 病理表现。该法所制得的模型,同样有细胞免疫的参与,因此其发病机制与人类 AA 相近。虽然该模型制造周期短,但其操作繁琐,胸腺悬液制备需要严格无菌。

4 评价与展望

实验室中对于 FA 动物模型主要通过敲除小鼠相关基因制备,当前实验室经常使用的 FANC 基因敲除小鼠发病后的血象特点与人类相似,但基因敲除所导致的 FA 模型动物表现出的发育异常、贫血和癌症倾向并不能完全模拟临床 FA 症状^[18-20],同时靶向于 FANC 基因的治疗结果也均不理想^[21-22]。

后天性 AA 动物模型在筛选 AA 治疗药物方面较为常用,其制备方法通常包括物理、物理联合化学、化学试剂联用以及免疫介导法。其中,化学试剂联用制造 AA 动物模型因为具有操作简便、试剂易得、评价方法成熟等优点而被大量采用,但是该法也存在与临床 AA 病理表现一致性不够高的缺点。物理、物理联合化学方法由于射线照射操作不便,因此较为少用,现在已经被化学试剂联合造模方法所替代。在 4 种后天性 AA 动物模型造模方法中,免疫介导法中的淋巴细胞输注法制造 AA 动物模型,与人类 AA 最为相似,但是其操作更加繁琐。后天性 AA 动物模型的另 3 种制造方法各有优缺点,但均有小鼠模型稳定性不够高以及外周血象(WBC、PLT、RBC、Hb)下降程度不一致的问题,因此在实际的实验造模过程中尚应根据具体实验需要进行选择和改进^[23-24]。

中医药在缓解造血功能障碍、治疗 AA 方面具有独特的优势,疗效稳定,毒副作用少,临床选方用药可以从解毒、化痰、化痰、补肾、健脾、益气、养血等多方面进行合理配伍以治疗。在研发新的防治 AA 中药新药过程中,我们需要合理选择契合度高的 AA 模型

以便能全面、准确评估中药的疗效并推荐用于临床适合类型。以上模型可用于初步筛选,但如果要更加合理评估中医药疗效,则需要以辨证为依据建立中医相应 AA 动物模型则更好,目前这方面工作尚有很多不足,希冀对 AA 有兴趣的临床和科研工作者进一步探索新的中医证型 AA 模型和中西医结合模型,从而能充分评估和显示中医药在治疗 AA 方面的优势。

参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] 苏攀柯.再生障碍性贫血模型建立及鉴定[J].河南医学研究,2017,26(15):2694-2696.
- [3] 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.
- [4] Zahnreich S,Weber B,Rösch G,et al. Compromised repair of radiation-induced DNA double-strand breaks in Fanconi anemia fibroblasts in G2[J]. DNA Repair (Amst), 2020,96:102992.
- [5] Zhang H,Kozono DE,O'Connor KW,et al. TGF- β inhibition rescues hematopoietic stem cell defects and bone marrow failure in Fanconi anemia[J]. Cell Stem Cell, 2016,18(5):668-681.
- [6] Bakker ST,de Winter JP,te Riele H. Learning from a paradox: recent insights into Fanconi anaemia through studying mouse models[J]. Dis Model Mech,2013,6(1):40-47.
- [7] Jamsai D,O'Connor AE,Deboer KD,et al. Loss of GGN leads to pre-implantation embryonic lethality and compromised male meiotic DNA double strand break repair in the mouse[J]. PLoS One,2013,8(2):e56955.
- [8] Bär C,Huber N,Beier F,et al. Therapeutic effect of androgen therapy in a mouse model of aplastic anemia produced by short telomeres[J]. Haematologica,2015,100(10):1267-1274.
- [9] Venkateswaran K,Shrivastava A,Agrawala PK,et al. Mitigation of radiation-induced hematopoietic injury by the polyphenolic acetate 7, 8-diacetoxy-4-methylthiocoumarin in mice[J]. Sci Rep,2016,16(6):37305.
- [10] 张乐,宋新龙,王爱迪,等. ¹³⁷Cs γ 射线联合环磷酰胺与氯霉素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,2019,27(2):527-533.
- [11] 贺今,郭春,黄涛,等.苯诱发再生障碍性贫血动物模型的免疫学评价[J].中国工业医学杂志,2015,28(6):441-443,481.
- [12] Chen YF,Zhao ZQ,Wu ZM,et al. The role of RIP1 and

- RIP3 in the development of aplastic anemia induced by cyclophosphamide and busulphan in mice[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014; 7(12): 8411-8420.
- [13] 刘香, 钟淑萍, 侯丽君, 等. 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.
- [14] 杜青, 何丹, 黄建华, 等. 四物膏对再生障碍性贫血模型大鼠骨髓造血功能的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(3): 92-98.
- [15] Putra WE, Rifa'i M. Assessing the immunomodulatory activity of ethanol extract of sambucus javanica berries and leaves in chloramphenicol-induced aplastic anemia mouse model[J]. *Trop Life Sci Res*, 2020, 31(2): 175-185.
- [16] Czechowicz A, Rio P, Bueren JE, et al. Changing the natural history of Fanconi anemia complementation group with gene therapy: early results of U. S. phase I study of lentiviral-mediated ex-vivo FANCA gene insertion in human stem and progenitor cells[J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2020, 26(3): S39-S40.
- [17] Wu D, Wen X, Liu W, et al. A composite mouse model of aplastic anemia complicated with iron overload[J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(2): 1449-1455.
- [18] Tsui V, Crismani W. The Fanconi anemia pathway and fertility[J]. *Trends Genet*, 2019, 35(3): 199-214.
- [19] Cohen-Haguenauer O, Péault B, Bauche C, et al. In vivo repopulation ability of genetically corrected bone marrow cells from Fanconi anemia patients[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(7): 2340-2345.
- [20] Lach FP, Singh S, Rickman KA, et al. Esophageal cancer as initial presentation of Fanconi anemia in patients with a hypomorphic FANCA variant[J]. *Cold Spring Harb Mol Case Stud*, 2020, 6(6): a005595.
- [21] Liu JM, Kim S, Walsh CE. Retroviral-mediated transduction of the fanconi anemia C complementing (FACC) gene in two murine transplantation models[J]. *Blood Cells Mol Dis*, 1995, 21(1): 56-63.
- [22] Brosh RM Jr, Bellani M, Liu Y, et al. Fanconi Anemia: A DNA repair disorder characterized by accelerated decline of the hematopoietic stem cell compartment and other features of aging[J]. *Ageing Res Rev*, 2017, 33: 67-75.
- [23] 郭雨晨, 董昌虎. 再生障碍性贫血动物模型研究进展[J]. *临床血液学杂志*, 2018, 31(3): 407-409.
- [24] 中华医学会血液学分会红细胞疾病(贫血)学组. 再生障碍性贫血诊断与治疗中国专家共识(2017 年版)[J]. *中华血液学杂志*, 2017, 38(1): 1-5.

(收稿日期: 2021-08-19)

(上接第 108 页)

参 考 文 献

- [1] 任小龙, 周晓东, 张军, 等. 高强度聚焦超声治疗子宫平滑肌瘤的病理变化及其超声随访研究[J]. *中国超声医学杂志*, 2006, 22(9): 714-716.
- [2] Vaezy S, Fujimoto VY, Walker C, et al. Treatment of uterine fibroid tumors in a nude mouse model using high-intensity focused ultrasound[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2000, 183(1): 6-11.
- [3] 张楠楠, 魏绍斌, 文怡, 等. 中药联合高强度聚焦超声治疗子宫肌瘤疗效及安全性 Meta 分析[J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2021, 37(12): 1259-1264.
- [4] 子宫肌瘤的诊治中国专家共识专家组. 子宫肌瘤的诊治中国专家共识专家组. 子宫肌瘤的诊治中国专家共识[J]. *中华妇产科杂志*, 2017, 52(12): 793-800.
- [5] 樊梦麟, 樊庆泊, 邢菲菲. 子宫肌瘤治疗方法研究进展及选择[J]. *中国现代医药杂志*, 2020, 22(7): 106-108.
- [6] 王桂玲, 郭静, 谢新才, 等. 贺普仁治疗妇科病验案举隅[J]. *中医杂志*, 2013, 54(8): 643-645.
- [7] 吴修红, 赵闯, 杨东霞, 等. 少腹逐瘀汤药理作用及临床应用的研究进展[J]. *中国临床保健杂志*, 2017, 20(5): 612-616.

(收稿日期: 2021-08-22)