

苯诱发再生障碍性贫血的动物模型研究

贺今¹, 郭春², 黄涛², 王秀英¹

1. 山东省济南医院, 山东 济南 250013; 2. 山东大学医学院, 山东 济南 250013

摘要: **目的** 观察苯诱发再生障碍性贫血(AA)模型的血象及病理改变,探讨最佳模型的造模方法。**方法** 60只雄性 CD1 小鼠,随机分为两组,对照组与 AA 模型组,每组各 30 只。AA 模型组给苯剂量为 2 ml/kg(以玉米油补足 4 ml/kg),对照组单纯注射玉米油 4 ml/kg。两组均每周 3 次注射,共注射 25 次。采用小鼠尾静脉取血法,用全自动动物血液分析仪检测血常规,并进行骨髓病理组织学检查。**结果** 与正常对照组相比,AA 模型组小鼠外周血红细胞、白细胞、血小板三系细胞均显著减低,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。骨髓病理组织学观察显示造血细胞减少,非造血细胞增加,各项指标符合 AA,提示本实验中苯诱发 AA 模型成功。**结论** 建立苯诱发 AA 动物模型可通过 CD1 小鼠每周 3 次皮下注射 2 ml/kg 苯,共注射 25 次获得;此方法简便、可靠、成功率高。

关键词: 苯; 再生障碍性贫血; 动物模型

中图分类号: R 556.5 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674-8182(2015)01-0102-02

再生障碍性贫血(aplastic anemia, AA)是骨髓造血衰竭疾病,苯是可诱导 AA 的重要工业毒物^[1]。苯中毒致 AA(benzene poisoning induced aplastic anemia, BPAA)是最常见的慢性苯中毒,是一组造血功能衰竭综合征,骨髓产生成熟血细胞的能力明显下降。为了探讨 BPAA 骨髓衰竭的发病机制及筛选有效的治疗药物,建立理想的 BPAA 模型尤为重要。目前, BPAA 动物模型的研究报道不一,本研究参考文献方法,建立了与人类病理改变相似的 BPAA 小鼠模型。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 苯(分析纯,国药集团化学试剂北京有限公司);玉米油(金龙鱼有限公司);全自动动物血液分析仪(日本 SYSMEX pocH-100iV Diff);光学显微镜(Olympus-IX71,图像采集及分析软件 DP2)。

1.2 实验动物 健康 CD1 雄性小鼠,8 周龄,重量约 20 g,SPF 级 60 只。由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。

1.3 动物分组与处理 将小鼠随机分为两组,正常对照组及 AA 模型组,每组 30 只。造模方法参照文献^[2-3],造模成功判定标准参照文献^[4]。对照组于小鼠背侧每周 3 次(周一、三、五)皮下注射玉米油 4 ml/kg。AA 模型组,每周 3 次(周一、三、五)于小鼠背侧皮下注射苯油混合液,给苯剂量为 2 ml/kg,注射总量均以玉米油补足至 4 ml/kg。

1.4 标本采集与检测 每周称重小鼠 1 次,根据体重变化调整注射剂量。共注射 25 次,建立 BPAA 模型小鼠 30 只。动物分别于注射苯油混合物后 10、15、20、25 次 2 d 后,随机抽查造模小鼠外周血象,三系细胞呈进行性下降,第 25 次最为明显,经骨髓活组织病理验证成模。

1.5 观察项目

1.5.1 一般情况观察 观察实验小鼠的精神状态、外部形态及体重变化。

1.5.2 血象检测 小鼠尾静脉取血 20 μ l 与 EDTA-K2 抗凝剂混匀,用于血常规分析,检测白细胞(WBC)、红细胞(RBC)、血红蛋白(Hb)、血小板计数(PLT)。

1.5.3 骨髓病理学观察 小鼠颈椎脱臼法处死,在无菌条件下取出一侧股骨进行病理学观察:取出小鼠股骨尽快置于 10% 甲醛溶液中固定,用体积分数为 5% 的硝酸溶液浸泡 7 ~ 12 h 脱钙后,经过常规脱水、石蜡浸泡包埋、切片、HE 染色,光学显微镜下观察组织细胞的形态结构。

1.6 模型成功判断标准 外周血三系细胞减少,正细胞性贫血,网织红细胞减少,骨髓活检示骨髓增生不良或低下(造血细胞容量 $< 40\%$,非造血细胞增多等改变),即判断为 AA 造模成功。

1.7 统计学处理 应用 SPSS 13.0 统计软件进行数据处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠一般情况观察 AA 模型组小鼠多次注射

苯以后,精神状态不佳,皮毛光泽差,部分小鼠有脱毛及皮损。以上表现随给苯剂量和时间的增加而明显。对照组变化不明显。

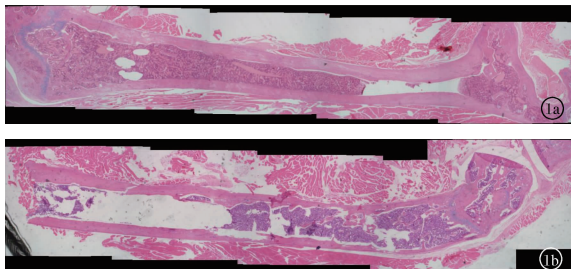
2.2 两组外周血象变化比较 与正常对照组比较,AA 模型组小鼠的 RBC、Hb、WBC、PLT 计数明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 1。

2.3 骨髓组织病理学变化 组织病理学观察显示,AA 模型组造血组织面积显著减少,脂肪细胞增多,骨髓间质血窦充血、出血伴水肿。见图 1a、图 1b。

表 1 两组小鼠外周血象变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	WBC ($\times 10^9/L$)	RBC ($\times 10^{12}/L$)	Hb (g/L)	PLT ($\times 10^9/L$)
正常对照组	30	13.56 \pm 4.37	12.37 \pm 2.11	16.13 \pm 1.55	1388.13 \pm 395.59
再障模型组	30	5.47 \pm 8.28 [#]	5.89 \pm 1.48 [#]	13.56 \pm 4.37 [*]	126 \pm 140 [#]

注:与正常对照组比较,^{*} $P < 0.05$,[#] $P < 0.01$ 。



注:1a:正常对照组;1b:AA 模型组

图 1 骨髓组织病理检查(HE 染色 $\times 100$)

3 讨论

苯是常见的化学毒物,慢性苯中毒主要造成血液系统损害,动物模型的建立是研究中毒性疾病必不可少的途径,各种造模方法各有其特点与不足,依据实验目的来选择相应实验动物模型是深入研究各种中毒发生发展机制的有效途径^[4]。国内外学者对 BPAA 的发病机制进行了一系列研究,取得了一定的成果。陈怡等^[5]通过体外培养骨髓单个核细胞,研究苯的代谢产物氢醌对其毒性作用,但体内的实验结果更接近真实情况。因此,建立一种简便、可靠的 BPAA 实验动物模型是深入研究苯的造血毒性必不可少的前提。近年来,国内外均进行了建立动物模型研究以阐明 BPAA 造血衰竭的发病机制。Velasco

等^[6]采用皮下注射苯 2 ml/kg 给 CD1 雄性小鼠,注射每周 3 次或 5 次,注射达到 20 次均可诱导 AA。李虹^[7]报道苯诱发的大鼠 AA 模型造模时间长达 2 个月。AA 的诱发需要以接触一定浓度的苯和一定接触时间为前提,这符合慢性苯中毒具有明确的剂量-效应关系,也与国外研究一致。BPAA 模型的多种建立方法表明建立理想的模型是需要较多样本量的积累,有许多因素会造成实验过程的差异,如毒物量的准确性和小鼠免疫反应的差异性。

本观察结果表明,AA 模型组小鼠一般情况、血细胞计数、骨髓病理学检查均有较明显的变化,符合 AA 模型标准。本研究采用全自动动物血液分析仪和骨髓活组织病理学检查,均提高诊断正确性,优于国内的普通血液分析仪及骨髓涂片检查^[2-3]。我们采取尾静脉血液进行血象检查,对小鼠机体损伤很小。本组无 1 例小鼠死亡,表明本造模是比较理想的方法,且采用苯注射法操作简便、剂量准确,优于吸入法,是建立 BPAA 小鼠模型的可靠方法,此模型的建立对于探讨慢性苯中毒引起的 BPAA 的发病机理及阐明药物作用机制具有广阔的前景。

参考文献

- [1] Chen J. Animal models for acquired bone marrow failure syndromes [J]. Clin Med Res, 2005, 3(2): 102-108.
- [2] 杨开颜,任行舟,万丽,等. 苯诱发小鼠再生障碍性贫血模型及氢磷汀干预的病理改变[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2006, 24(7): 430-432.
- [3] 李锐,陈文娜,范梦天. 苯诱发再生障碍性贫血小鼠模型建立[J]. 中国公共卫生, 2010, 26(6): 738-739.
- [4] 赵波,菅向东,张忠臣,等. 几种中毒性疾病实验动物模型研究进展[J]. 毒理学杂志, 2009, 23(6): 502-505.
- [5] 陈怡,俞康,吴建波,等. 体外培养下氢醌诱导骨髓单个核细胞凋亡的研究[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2004, 22(3): 161-164.
- [6] Velasco Lezama R, Barrera Escorcía E, Muñoz Torres A, et al. A model for the induction of aplastic anemia by subcutaneous administration of benzene in mice [J]. Toxicology, 2001, 162(3): 179-191.
- [7] 李虹,卢义钦,彭兴华,等. 人参总皂甙对苯诱发再障大鼠红细胞中四种已糖利用的影响[J]. 湖南医科大学学报, 1994, 19(5): 381-384.

收稿日期:2014-09-10 修回日期:2014-10-10 编辑:王国品